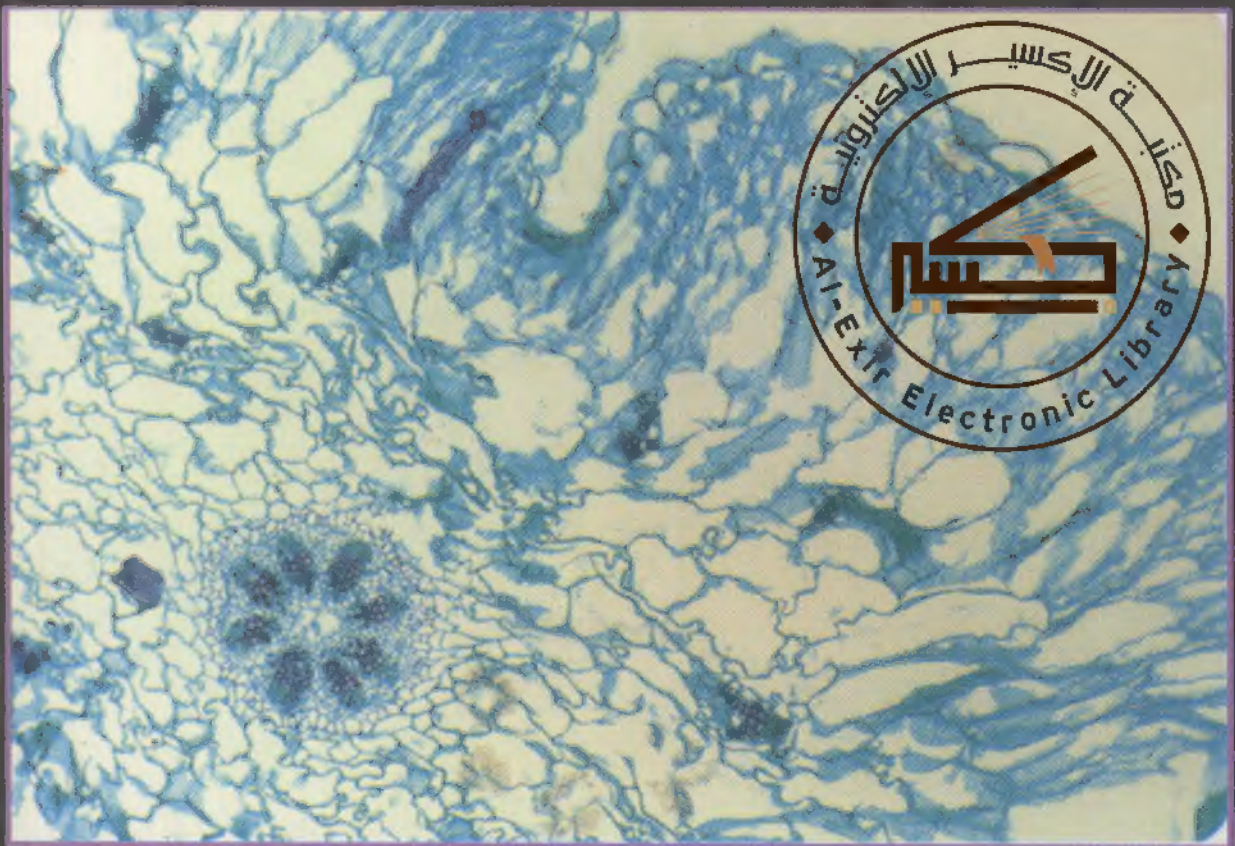


# التحضيرات النباتية

## والفحص المجهرى

( الميكروتيكنيك )



د. محمد عبد العزيز نصار      د. قاسم فؤاد السحار



المكتبة الأكاديمية



**التحليل الطيفي والكيمائية**  
للزيوت والدهون

# التحضيرات النباتية والفحص الجزي ( الميكرو تكنيك )

دكتور

**قاسم فؤاد السحار**

أستاذ بقسم النبات الزراعى  
كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور

**محمد عبد العزيز نصار**

أستاذ بقسم النبات الزراعى  
كلية الزراعة - جامعة القاهرة



الناشر

**المكتبة الاكاديمية**

**١٩٩٨**

### حقوق النشر

الطبعة الأولى : حقوق التأليف والطبع والنشر © ١٩٩٨  
جميع الحقوق محفوظة للناشر :

المكتبة الأكاديمية

١٢١ ش التحرير - الدقى - القاهرة

تليفون : ٣٤٨٥٢٨٢ / ٣٤٩١٨٩٠

فاكس : ٢٠٢ - ٣٤٩١٨٩٠

لا يجوز استنساخ أى جزء من هذا الكتاب أو نقله بأى طريقة كانت إلا بعد  
الحصول على تصريح كتابى من الناشر .

## مقدمة

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ ، والحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على أفضل الخلق أجمعين محمد الرسول الأمين ، خاتم الأنبياء ، وسيد المرسلين ، وعلى آله وصحبه والتابعين .

مع اكتشاف زخارياس جانسن Zacharias Jansen للمجهر الضوئي فى عام ١٥٩٠ بدأ الإنسان رحلته فى دراسة التركيب الدقيق للكائنات الحية ليعرف ما تضم من أنسجة مختلفة ، ولاشك أن أى تقدم فى فهم التركيب الداخلى للكائنات الحية يقوم على ركيزتين أساسيتين ، تتمثل الركيزة الأولى فى كيفية إعداد العينة المطلوب دراستها للفحص المجهرى ، والركيزة الثانية هى التقدم فى صناعة البصريات وبالتالى المجهر المستخدم فى الفحص .

تفتقر المكتبة العربية إلى مؤلفات تتناول أى من هاتين الركيزتين ويهدف هذا الكتاب إلى تقديم جهد متواضع فى هذا الشأن ليتفجع به كل دارس للنباتات يحاول إمادة اللثام عن التركيب التشريحي لها سواء كان باحثاً فى مجال علم تشريح الأنسجة Histology أم علم الوراثة Genetics أم علم أمراض النبات Plant pathology أم علم الخلية Cytology أم علم الأجنة Embryology أم علم جبوب اللقاح Palynology .

يتناول هذا الكتاب بالشرح المبادئ العامة لكيفية تجهيز معمل للميكرووتكنيك النباتى وما يتطلبه من أدوات وأجهزة وكيمائيات مختلفة كذلك الاحتياجات الواجبة وأسلوب العناية اللازمة للحصول على نتائج دقيقة - كما يتناول الكتاب أيضاً كيفية تحضير العينة منذ أخذها من النبات حتى تحضير الشريحة للفحص المجهرى وتحليل النتائج - ولم يغفل الكتاب أيضاً تقديم شرح مبسط لكل من المجهر الضوئى والمجهر الإلكتروني بنوعيه المتخلل والمساح حتى

يكون العرض شاملاً لمختلف الجوانب التي يتطلبها من ينشد دراسة التركيب الدقيق للنباتات .

نسأل الله العلى القدير أن يكون لهذا الجهد المتواضع فائدته المنشودة للمهتمين بعمل التحضيرات النباتية الدقيقة للفحص المجهرى ، وأن يكون حافزا لمزيد من الدراسة النباتية التي تضيف الجديد للعلم فى وطننا العربى .

المؤلفان

# المحتويات

الموضوع	الصفحة
مقدمة	٥
المحتويات	٧
تمهيد	١٥
١ - المبادئ العامة	
- الأدوات والأجهزة الواجب توافرها في العمل	١٩
أولاً : أدوات التشريح	١٩
ثانياً : الأدوات الزجاجية	٢٠
ثالثاً : الأجهزة	٢١
رابعاً : متنوعات	٢٢
- القواعد الواجب اتباعها في العمل	٢٣
- العناية بالأدوات الزجاجية	٢٤
- تحضير المحاليل المختلفة	٢٥
- جمع وتخزين العينات النباتية	٣٠
٢ - القتل والتثبيت	
- صفات المحاليل المستخدمة في القتل والتثبيت	٣٦
- محاليل القتل والتثبيت	٣٧
- إجراء عملية القتل والتثبيت	٤٣
- تركيب المحاليل المستخدمة في القتل والتثبيت	٤٥
- محاليل حفظ النماذج النباتية	٥٢

## الصفحة

## الموضوع

## ٣ - التجفيف ( طرد الماء )

- ٥٧ - الترويق

## ٤ - الطمر ( الصب في القوالب )

- ٦١ - أولاً : الطمر في شمع البارافين  
٦٢ - التشريب في شمع البارافين  
٦٤ - الترقيد في شمع البارافين  
٦٦ - ثانيًا : الطمر في السللويدن  
٦٧ - ثالثًا : الطمر المزدوج في السللويدن وشمع البارافين  
٦٧ - رابعًا : الطمر في أشباه شموع تذوب في الماء

## ٥ - الميكروتومات

- ٦٩ أولاً : الميكروتوم الدوار لقطاعات شمع البارافين  
٦٩ - الإرشادات الأساسية للميكروتوم الدوار  
٧٤ - مشكلات عملية القطع بالميكروتوم الدوار والحلول المقترحة  
٧٥ ثانيًا : الميكروتوم المنزلق لقطاعات السللويدن  
٧٧ - الإرشادات الأساسية للميكروتوم المنزلق  
٧٨ - مشكلات عملية القطع بالميكروتوم المنزلق والحلول المقترحة  
٧٩ ثالثًا : ميكروتومات القطاعات الثلجية ( المبردة )  
٧٩ (أ) الميكروتوم الثلجي  
٨٠ - الإرشادات الأساسية للميكروتوم الثلجي الاكينيكي  
٨١ - مشكلات القطع بالميكروتوم الثلجي والحلول المقترحة  
٨٢ (ب) ميكروتوم الكريوستات  
٨٣ - الإرشادات الأساسية لميكروتوم الكريوستات  
٨٤ - مشكلات القطع بميكروتوم الكريوستات والحلول المقترحة



## الصفحة

## الموضوع

- ٨٥ رابعاً : الميكروتوم الفائق لقطاعات المجهر الإلكتروني
- ٨٨ - سكين الميكروتوم
- ٦ - قطع العينات
- ٩٠ - قطع العينات النباتية المغمورة في شمع البارافين
- ٩٠ - تجهيز القوالب للقطع بالميكروتوم
- ٩١ - العوامل التي تؤثر على عملية القطع
- ٩٤ - قطع العينات النباتية غير المغمورة في شمع البارافين
- ٩٤ - أولاً : القطاعات اليدوية
- ٩٥ - ثانياً : القطع بواسطة الميكروتوم
- ٩٥ (أ) القطع بواسطة الميكروتوم الثلجي
- ٩٦ (ب) القطع بواسطة الميكروتوم المتزلق
- ٩٧ - قطع العينات النباتية المغمورة في السللويدن
- ٧ - لصق القطاعات على الشرائح
- ٩٩ - خطوات العمل
- ١٠١ - إزالة الشمع
- ١٠١ - لصق القطاعات التي تعمل باليد أو بالميكروتوم الثلجي أو المتزلق
- ٨ - الصبغ
- ١٠٥ - أولاً : الصبغات الطبيعية
- ١٠٧ - ثانياً : الصبغات الصناعية
- ١٠٨ - الاستعمالات النباتية الأساسية للصبغات الشائعة
- ١١١ - أولاً : الصبغة المفردة
- ١١٦ - ثانياً : الصبغ المزدوج

## ٩ - التخميل والتغطية

- ١٢٦ - خطوات إجراء التخميل والتغطية

## ١٠ - دراسات تشريحية خاصة

- ١٢٧ أولاً : تفكيك نسيج الخشب
- ١٢٨ ثانياً : دهك الأنسجة ( طريقة الأسيتوكارمين )
- ١٣١ ثالثاً : الدراسة التشريحية للعقدة وعنق الورقة بواسطة القطاعات اليدوية
- ١٣٣ رابعاً : الطرق المتبعة لدراسة تشريح الورقة والزهرة
- ١٣٣ (أ) إزالة اللون
- ١٣٤ (ب) سلخ البشرة
- ١٣٦ خامساً : بعض الطرق المستعملة لتجهيز العينات التشريحية لأمراض النبات
- ١٣٦ (١) الفطريات البيضاء
- ١٣٨ - برشمة التحضير
- ١٣٨ (أ) طريقة التطويق
- ١٣٩ (ب) طريقة ديهل
- ١٤٠ - الصبغ المستديم
- ١٤٢ - قطاعات البارافين
- ١٤٢ (٢) الفطريات الزيتية ( اللاقحية )
- ١٤٤ (٣) الفطريات الاسكية ( الزقية )
- ١٤٦ (٤) الفطريات البازيدية ( الهراوية )
- ١٤٦ (أ) أمراض التفحم
- ١٤٦ (ب) الأصداء
- ١٤٨ (٥) الفطريات الناقصة

الصفحة

الموضوع

١٥١	١١ - المجهر
١٥١	أسسيات لفحص المجهرى
١٥١	البصريات
١٥١	بصريات المجهر الصوتى
١٥٥	- خصائص العدسات الشئية
١٥٥	(١) التكسر
١٥٥	(٢) مسافة الشغل
١٥٥	(٣) البعد البؤرى
١٥٦	(٤) عمق الرؤيا
١٥٦	(٥) قوة تمييز
١٥٧	(٦) التوافق
١٥٧	(٧) أنواع الشئيات
١٥٧	- خصائص العدسات العينية
١٥٩	الإضاءة
١٦٠	- التكبير
١٦١	- أنواع المجاهر
١٦١	أولاً . المجهر لبيط
١٦٣	ثانياً . المجهر لمركب ( الضوئى )
١٦٣	تركيب المجهر الضوئى
١٦٥	استعمال المجهر الصوتى
١٦٨	- ملحقات المجهر

الصفحة	الموضوع
١٦٨	(١) الميكروميتر
١٦٨	(١) القطعة العينية للميكروميتر
١٦٩	(ب) الشريحة الميكرومترية
١٦٩	(٢) كاميرا لوسيدا
١٧٠	- فحص الشرائح بالمجهر
١٧٧	ثالثاً : المجهر الإلكتروني
١٨٠	- المجهر الإلكتروني المتخلل
١٨٧	- مشاهدة وتسجيل الصورة
١٨٩	المشاهدة من خلال شاشة تلفزيون
١٨٩	- التفريغ
١٨٩	- الإلكترونيات
١٩	- توجيه والتعامل مع العينة
١٩٠	- استخدام المجهر الإلكتروني لتخلل وإعداد العينة
١٩١	- المجهر الإلكتروني المساح
١٩٤	- مدفع الإلكترونات
١٩٥	الكشف عن الإلكترونات
١٩٥	- التكبير والإظهار
١٩٦	مشاهدة وتسجيل الصورة
١٩٦	- معاملة الصورة
١٩٦	- التفريغ
١٩٧	- الإلكترونيات
١٩٧	توجيه والتعامل مع العينة

## الصفحة

## الموضوع

١٩٧	- استخدام المجهر الإلكتروني المساح وإعداد العينة
١٩٩	- الفحص المجهرى الإلكتروني المساح المتخلل
١٩٩	- تجهيز العينات
٢٠٠	- الحصول على العينات
٢٠٠	- التثبيت
٢٠١	- المحاليل المثبتة
٢٠٥	- إجراء عملية التثبيت
٢٠٥	- التجفيف والتشرب
٢٠٥	- المواد المستخدمة
٢٠٧	صنع قوالب العينات والقطاعات الثلجية
٢٠٧	- فحص لخلية بالمجهر الإلكتروني
٢٠٧	- الغشاء الخلوى
٢٠٧	- النواة
٢٠٨	- الشبكة الاندوبلازمية
٢٠٨	أجسام جولجى
٢٠٨	- الميتوكوندريا
٢١٣	رابعًا : أنواع المجهر الحديثة

## المراجع

- أولاً : المراجع العربية  
 ثانيًا : المراجع الأجنبية  
 ثالثًا : كتالوجات



## تقديم

تشكل الدراسة العملية للعلوم البيولوجية عامة وعم النبات خاصة القاعدة الأساسية لهذه العلوم لما توفره للدارس من خبرات مباشرة ، وصورة شاملة واعية للعينة موضع الفحص يرتبط فيها الجزء بالكل ويتضح من خلالها التناسق والتنسيق بين هذه الأجزاء لتكون كلاً متكاملًا ، وهو ما لا يمكن - أو قد يصعب - تخيله ذهنيًا بدون الفحص العملي الدقيق ، ومن هنا كانت أهمية الدراسة العملية .

ومن الدراسات العممية التي على درجة عظيمة من لأهمية دراسة الميكروتيكنيك النباتي ، ويقصد بها تحضير الشرائح سواء كانت مؤقتة أم مستديمة والتي تهيب للباحث القدرة على فحص التركيب الداخلي للأعضاء النباتية المختلفة مما يتيح له فرصة تعرف تركيب النبات ، وما قد يكون لذلك من أهمية في تفسير عديد من الظواهر العلمية المختلفة . وقد ساهمت هذه الدراسة في تطور وتقدم الكثير من العلوم النباتية مثل : علم التشريح Anatomy - وعلم الخلية Cytology - وعلم الأنسجة Histology - وعلم حساب اللقاح Palynology - وعلم الأجنة Embryology - وعلم التقييم Taxonomy - وعلم الأمراض Pathology - وعلم الوراثة Genetics - وعلم الفسيولوجى Physiology - وعلم لتربية Breeding - وعلم رعة الأنسجة Tissue - culture .

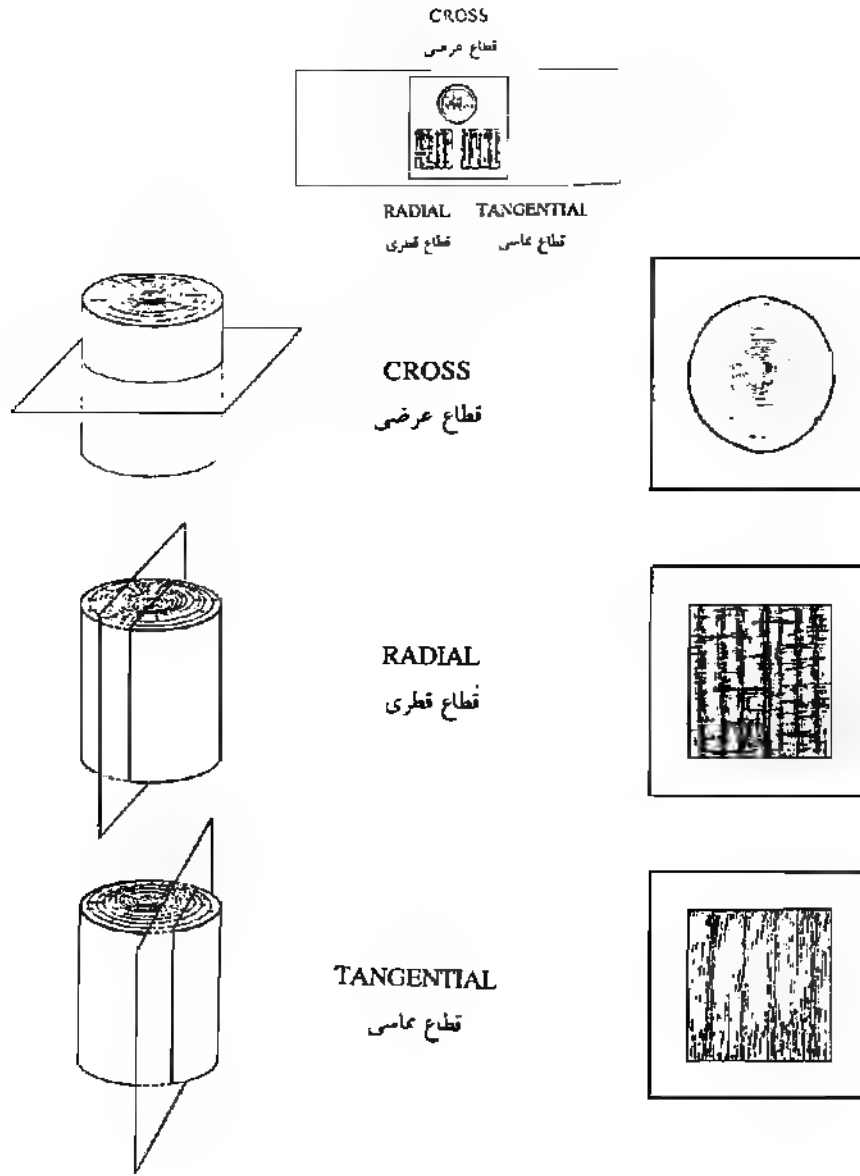
تعتبر دراسة لميكروتيكنيك النباتي أمراً يسيرا من الوجهة لنظرية وإن كانت من الوجهة العملية تحتاج إلى صبر وممارسة طويلة حتى يمكن للمرء إتقانها واكتساب الخبرة التي تمكنه من الحصول على أفضل النتائج المرجوة عند تحضير الشرائح ويعقب تحضير الشرائح قراءتها ثم رسمها أو تصويرها ، إذ إن تحضير الشرائح لا يعتبر هدفاً في حد ذاته ، وتتوقف طريقة تحضير الشرائح على الهدف الذي من أجله تحضر عملية التحضير والمجال العلمى الذى سوف تستخدم فيه هذه الشرائح . فقد يكون لتحضير لمجرد دراسة أولية تلقى الضوء على مايلها من تحضيرت لشرائح مستديمة . حيث يقوم الباحث أولاً بعمل تحضيرات مؤقتة ثم من قراءتها يحدد الأجراء التي يرى أن لها أهمية في دراسته

قد يتطلب الأمر تحضير شرائح مستديمة لقطاعات سلسلة Serial sections كما هو الحال عند دراسة القمم السامية وعند دراسة سلوك الخزم الوعائية سواء في الأعضاء الخضرية أو الزهرية . ويجب عند دراسة القمم النامية أو السراعم عدم تغيير السمك الذى يتم القطع عليه مع المحافظة على نظام تسلل القطاعات على كل شريحة وكذلك ترتيب الشرائح المتعاقبة حتى يتسنى تحديد البعد الذى يبدأ عنده تكشف كل ورقة والبراعم الموجودة فى آباط الأوراق وعددها وكذلك البعد الذى يتم عنده تكشف نسيج الخشب ونسيج اللحم وبداية تكشف الفجوات فى الخلايا إلى غير ذلك من الدراسات التشريحية . ويتم تحديد هذه الأبعاد من خلال تقدير سمك وعدد القطاعات ، لذلك يلزم عدم إهمال أى من القطاعات ونظام تسلسلها أو تغيير سمك القطع .

يتطلب الأمر عند تحضير شرائح للدراسات المرضية أن يكون القطع فى موضع الإصابة وإلى أعلاها وأسفلها ، ولايلزم فى هذه الحالة تحضير قطاعات سلسلة ، ويجب أن تبدأ الدراسة من بداية العدوى الصناعية وعلى مراحل حتى المرحلة الأخيرة من تقدم المرض .

تجهز القطاعات بالقطع فى اتجاهات مختلفة ( شكل ١ ) فقد تكون عرضيا Transverse أو طوليا Longitudinal أو مماسيا Tangential أو مائلا Oblique أو قطريا Radial وقد يحتاج الأمر إلى عمل سلخ فى البشرة Epidermal peel أو كشط Scrape . وعند دراسة أشكال الخلايا ودراسة النقر تحرى عملية تفكيك Maceration للأنسجة لتحديد الشكل المنظور للجسم للخلايا ، أما عند دراسة مسار الخزم الوعائية فى الأجزاء الرقيقة كالأوراق والسبلات والبتللات والسوق اجوفاء فيمكن إزالة الكلوروفيل بمعاملة هذه الأجزاء النباتية كيميائيا لترويقها أى جعلها شفافة Clearing ثم بعد ذلك تحرى الدراسة المطلوبة . ويجرى عد الكروموسومات فى الدراسة الوراثية والسيولوجية بعمل دهن Smearing للأنسجة خاصة المرستيمية ( القمم النامية ) وكذلك المتوك وتستخدم صبغة الاسيتوكارمين حتى يتسنى تحديد عدد الكروموسومات





#### Placement of twig sections

شكل (١) : لائحيات المختلفة بتقطيع عينة من ساق النبات .

( ويلى Willey ١٩٧١ )



## ١ . المبادئ العامة

### الادوات والاجهزة الواجب توافرها فى المعمل

اولاً: ادوات التشريح ( شكل ١ - ١ )

(١) مجموعة ملاقط متكاملة Different types of forceps

توجد أنواع كثيرة من الملاقط منها ما هو مذبذب الطرف مسنوج ، ومنها ما هو منقطع الطرف ، ومنها ما يكون طرفه مستديراً وليس مستدق وكل منها استعمالاته الخاصة ، وكلها تستعمل فى حمل وتناول الأجزاء النباتية المختلفة أو الإمساك بالادوات الرفيعة .

(٢) مقص أو أكثر Scissors

ويستعمل فى معامس البت عادة ذلك النوع ذو الطرف المذبذب الرفيع .

(٣) إبر تشريح Needles

وهى إما مستقيمة أو منحنية وتستخدم فى فرد وتفتيح الأجزاء النباتية لإبرار تركيبها الداخلية ، كما تستخدم فى تنظيم لعينات النباتية ( المطمورة فى شمع البارافين ) أثناء عملية الصب فى القوالب فى صفوف فى لوضع الملائم للقطع .

(٤) مشرط Scalpel

ويستخدم فى تجزئة العينات النباتية .

(٥) موسى التشريح Dissecting razor

ويستخدم فى عمل لقطعات اليدوية خلال العينات النباتية الحية أو المحفوظة ، ويمكن لشخص المتمرن الماهر الحصول على قطاعات دقيقة لدراسة التركيب لداخلى للينة تحت لدرسة .

(٦) فرشاة Brush

وتستخدم فرشاة ذات شعر ناعم لحمل القطاعات والأجزاء لنباتية الرقيقة بنظف حتى لاتتهدك الأنسجة أثناء لتعامل معها .

## ثانياً : الأدوات الزجاجية

### (١) مجموعة من الزجاجات Reagent bottles

ذات سعات مختلفة ( ٢٥٠ - ٥٠٠ مل ) وتستعمل فى تحضير المحاليل ذات التركيزات المختلفة ، وتفضل الزجاجات ذات الغطاء الزجاجى المصنفر .

### (٢) مجموعة من الأقناع Funnels مختلفة القطر ( شكل ١ - ٢ )

(٣) قضيب زجاجى لتقليب المحاليل .

### (٤) مجموعة من المخابير Cylinders

توفر مجموعة من المخابير المدرجة مختلفة السعة ( ٢٥ - ١٠٠ - ٢٥٠ - ٥٠٠ - ١٠٠٠ مل ) .

### (٥) ماصة مدرجة أو أكثر Pipette

وتستخدم فى نقل المحاليل عند تحضيرها .

(٦) مجموعة من الكاسات Beakers مختلفة السعة ( ٢٥ - ١٠٠ - ٢٥٠ - ٥٠٠ - ١٠٠٠ مل ) .

(٧) أنابيب ذات غطاء محكم من الفلين Corked vials لحفظ العينات النباتية خلال المراحل المتتالية لإعدادها وكذلك الحوامل الخاصة بها .

(٨) مجموعة من زجاجات لسعة Watch glass مختلفة السعة .

وهى آتية زجاجية مقعرة توضع فيها العينات النباتية أو القطاعات ( التى تجرى باليد باستخدام موسى التمشيح أو بواسطة الميكرونوم المنزلق أو للجلجى حيث لايتكون شريط فى كلتا الحالتين ) لإجراء عملية الصبغ

(٩) شرائح زجاجية Slides وأغطية للشرائح Covers تستعمل الشرائح فى تحميل القطاعات تمهيداً لفحصها مجهرياً ، ويستحسن من الشرائح ذات الحافات المستديرة ، أما الأغطية فيفضل أن تكون بالشكل المناسب ( مربعة - مستطيلة - مستديرة ) لنوع الدراسة .

## (١٠) زجاجات التقطير Dropping bottle with pipette

زجاجات ذات غطاء خاص مزود بقطارة تستخدم لحفظ محلول اللصق ، ومحلول التعويم ، ومحاليل الاصباغ أو الكواشف . وتسهل القطارة أخذ كميات صغيرة من هذه المحاليل .

## (١١) أحواض الصبغ Staining trough with grooves and cover

وتعرف باسم Coplin jars وهى أحواض من الزجاج ذات تجاويف خاصة ، يمكن أن توضع فيها مجموعة من الشرائح الزجاجية المحملة بقطاعات العينات النباتية بحيث تكون بينها مسافات كافية ، وعملاً هذه الأحواض بالمحاليل المستخدمة فى عملية الصبغ حيث تغمر الشرائح بهذه المحاليل للفترة المطلوبة وتغطى بالغطاء الزجاجى الخاص بهذه الأحواض ، وتستبدل المحاليل حسب الحاجة ( شكل ١ - ٢ ) .

(١٢) زجاجة للكندا بلسم Canada balsam bottle أو لغيره من البهئات الأخرى التى تستعمل فى التحميل

وهى زجاجة خاصة صغيرة مزودة بقبض زجاجى رفيع وغطاؤها قبرى الشكل

## ثالثاً: الأجهزة

## (١) مسطح ساخن Hot plate

يشبه المائدة الصغيرة ومزود بمسخن كهربائى ، تصل درجة حرارته إلى نحو  $٤٠^{\circ}\text{C}$  - ويستخدم أثناء صب عينات الشمع فى القالب أو لفرد القطاعات بعد لصقها على الشرائح ( شكل ١ - ٢ ) .

## (٢) فرن شمع Wax oven

ويتركب فرن الشمع من حجرتين السفلية منهما درجة حرارتها تصل إلى  $٦٠^{\circ}\text{C}$  م لصهر الشمع ( يستخدم شمع البارفين ) والعلوية تصل درجة حرارتها إلى نحو  $٤٠^{\circ}\text{C}$  م وتستخدم فى تجفيف الشرائح بعد تمام تحضيرها

## (٣) ميكروتوم Microtome

ومنه الدائرى Rotary والثلجى Freezing والمتزلق Sliding ويختلف الاستعمال تبعاً

لنوع العينة النباتية وطبيعتها ومهارة لشخص نفسه . حيث ستعمل الميكروتوم لنثرى للعينات لنباتية المظمورة فى الشمع فقط ، أما الميكروتوم الشحى فيستعمل للعينات المقتولة أو غير المقتولة وخاصة لرهيف منها ، وذلك بعد تغليف النموذج من جميع جهاته بمحلول الصمغ وعمل كتلة ثلجية من ثنى أكسيد الكربون لصب Solid CO<sub>2</sub> يحيط بالعينة فيسهل عملية انقطع . ويستخدم الميكروتوم المثلث للعينات النباتية الصلبة ( المقتولة أو غير المقتولة ) أو المظمورة فى الشمع أو السيلويد Celloidin .

(٤) ميزان حساس Balance

ويستخدم فى إعداد أوزان الكيمائيات الجافة المستخدمة فى تحضير بعض المحاليل الضرورية فى خطوات العمل المختلفة . وكذلك لوزن الصبغات المطلوب تحضيرها .

(٥) مجهر Microscope

ويستخدم فى فحص وقراءة الشرائح ، ويجب حماية مائدة المجهر بقطعة من الزجاج عند فحص الشرائح أثناء صبغها إذا ما تطلب الأمر التأكد من مدى تأثير الأنسجة بالصبغات المستخدمة

(٦) جهاز ماء مقطر Distilled water apparatus

(٧) الآلة الدوارة ( المائدة الدوارة ) Turn table

وهى تستعمل فى برشمة التحضير بطريقة التصويت وفيها يتم لحام العطاء الزجاجى المسدير بالشريحة لمنع حفاف بيثة التحميل وبذلك يمكن حفظ التحضير بحالة جيدة مدة طويلة من الزمن .

## رابعاً: متونوعات

(١) موقد غاز .

(٢) قلم شمع Wax pen

ويستعمل فى كتابة البيانات على لأواى الزجاجية والشرائح .

(٣) ورق ترشيح ذو مقاسات مختلفة Filter papers

ويستخدم لترشيح بعض المحاليل إذا تطلب الأمر ذلك ، ولإزالة البراند من محاليل لتعوم والصيغ على الشريحة .

- (٤) علب خاصة لحفظ الشرائح .
- (٥) مجموعة الكيماويات الخاصة بكل عملية تبعاً لنوع العينة المراد تجهيزها والهدف من دراستها مثل الكحولات المختلفة ، والأصباغ ، والشمع وغيره .
- (٦) عدسة مكبرة Hand lens ذات قوة تكبير ٥ أو ١ لفحص العينات النباتية والتأكد من سلامتها ، وكذلك لفحص حافة سكين الميكروتوم .

### القواعد الواجب اتباعها في المعمل Laboratory rules

- (١) تنظيم محتويات المعمل في أماكنها الثابتة مع مراعاة النظافة التامة لكل شيء
- (٢) تحديد خطوات العمل بدقة متناهية قبل البدء فيه أى الوقوف مسبقاً على ما يجب عمله في الموضوع تحت الدراسة .
- (٣) وضع نطاقات بأسماء الزجاجات المختلفة وتركيز كل محلول أو مادة به ، ويجب أن تكون الاوانى والادوات الزجاجية دائماً نظيفة قبل الاستعمال وبعده
- (٤) العناية التامة بنظافة الأيدي ، مع الاحتراس الشديد عند استخدام المواد السامة مثل الفينول Phenol ولسليمانى Mercuric bichloride .
- (٥) يجب الاحتفاظ بسجل لتدوين كل العمليات التى تجرى أثناء لعمل وكذلك كل الخطوات التى يجب اتباعها فى كل عملية
- (٦) عند تحضير لأصباغ يجب أن يتم وزنها على ورقة ناعمة حتى لا تتأثر كفة الميزان بالصبغة .
- (٧) لا تسكب مطلقاً شمعاً سائلاً ( مصهوراً ) فى البالوعة حتى لا يتسبب فى انسدادها .
- (٨) احترس جيداً فى حالة استعمال حامض الأورميث Osmic acid لأن تخرته المتطايرة تضر بالعين ولذا يذاب بكر الانابيب المحتوية عليه تحت الماء .
- (٩) يجب أن تكون المحاليل التى ستستعمل فى أى عملية مجهزة ، قس لقيام بإجرائها .
- (١٠) لا تعرض زجاجات الكدا بلسم للضوء حتى لا يتخثر الزيتول ، كما أن السسم قد يتحول بتأثير لضوء إلى مادة أكثر حموضة وهذه تضر بالصبغة .

(١١) يجب أن تكون الأجزاء النباتية بحالة طازجة Fresh ، كما يجب عدم إحداث أى ضرر لها سواء بالضغط أو بالالتواء . ويجب أن تنظف تمامًا من أى أتربة عالقة بها بواسطة فرشاة ناعمة .

(١٢) يجب أن توضع الأجزاء النباتية المقطوعة فى محاليل الثبيت فى الحال حتى لا يطرأ عليها أى تغير مع عدم تعرضها للهواء لمدة طويلة أثناء تغيير المحاليل .

(١٣) يجب دراسة الطرق المختلفة واختيار ما هى أنسب من غيرها طبقا لحالة الأنسجة المراد دراستها .

(١٤) هناك ملاحظات خاصة بكل عملية يجب تدوينها ومعرفتها لاتباعها .

### العناية بالادوات الزجاجية Glassware

تتطلب خطوات العمل المختلفة بالميكروتكنيك استعمال أدوات زجاجية على درجة فائقة من النظافة سواء كانت هذه الأدوات أوانٍ أو زجاجات أو شرائح أو أغشية شرائح أو غيرها .

فإذا كانت هذه الأدوات الزجاجية حديثة وتستعمل للمرة الأولى فإنه يلزم غسلها جيدًا بالماء والصابون ( أو أحد المنظفات الصناعية ) ثم إعادة غسلها جيدًا بالماء فقط لإزالة أى أثر للصابون أو للمنظف الصناعى وتجفف بعد ذلك وتحفظ لحين استعمالها ، ويفضل بالنسبة للشرائح وأغظيتها أن تحفظ فى كحول إيثايل بتركيز ٩٥ ٪ لحين الحاجة لاستعمالها .

قد يتطلب الأمر استعمال أدوات زجاجية سبق استخدامها ، فى هذه الحالة تنظف تلك الأدوات بواسطة محلول مكون من بيكرومات البوتاسيوم Potassium bichromate وحامض الكبريتيك المركز Sulphuric acid ويستعمل هذا المحلول بتركيزات مختلفة كما يلى

(١) المحلول المركز ويتكون من :

٣٠٠ مل	ماء مقطر
٦٠ جم	بيكرومات البوتاسيوم
٤٦٠ مل	حامض كبريتيك مركز



ويحصر هذا المحلول فى أودٍ تتحمل درجة الحرارة المرتفعة ، حيث تذاب بيكرومات البوتاسيوم فى الماء بالتسخين ثم يترك المحلول الناتج حتى يبرد ، يضاف إلى هذا المحلول بعد ذلك حامض الكبريتيك المركز ببطء .

(٢) المحلول متوسط التركيز ويتكون من :

٣٠٠ من	ماء مقطر
٦٠ جم	بيكرومات البوتاسيوم
٣٠٠ مل	حامض كبريتيك مركز

(٣) المحلول المخفف ويتكون من :

١٠٠٠ مل	ماء مقطر
٦٠ جم	بيكرومات البوتاسيوم
٦٠ مل	حامض كبريتيك مركز

عند تنظيف الشرنج اسقطها الواحدة تلو الأخرى حتى تتعرض بالكامل للمحلول ، اتركها لمدة ٢٤ ساعة على الأقل ثم اغسلها جيداً بماء جارٍ حتى يزول كل أثر للمحلول . يستحسن حفظ الشرائح بعد ذلك فى كحول إيثايل ٩٥ ٪ مع مراعاة إسقاط الواحدة تلو الأخرى أيضاً .

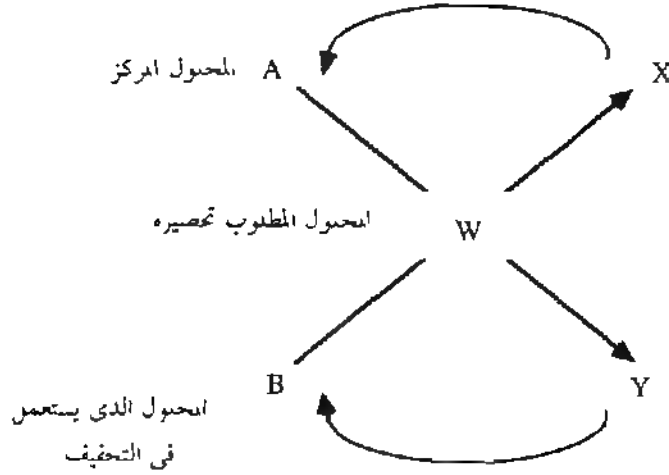
### تحضير المحاليل المختلفة Preparation of different solutions

يجب أن تكون الأوعية المستخدمة فى تحضير المحاليل رجاجية ونظيفة تماماً ( كالزجاجات والمخابير ) وتخصص المحاليل كالتالى :

(١) تحضير محلول من مادة جافة بنسبة مئوية . أوزن الكمية المطلوبة من المادة وأضف إليها كمية الماء اللازمة .

(٢) تحضير محلول من مادة سائلة ( كالفورمالين أو حامض لحنيك أو الكحول مثلاً ) بنسبة مئوية معلومة : قس كمية لسانتر فى مخبر مدرج وأضف إليه كمية من الماء المقطر لتكمل الحجم المطلوب على أساس هذه النسبة الخاصة . شال ذلك إذا أردت تحضير محلول من الفورمالين قوته ( تركيزه ) ٤ ٪ / أضف ٤ مل من الفورمالين إلى ٩٦ مل من الماء المقطر .

(٣) استعمال الطريقة السهلة الآتية إذا احتاج الأمر تحضير محلول بنسبة معينة من محاليل محصورة معروفة القوة . وتعرف بطريقة مربع بيرسون Pierson's square ( Criss cross ) .



حيث :

A تمثل قوة المحلول لذي ستم تخفيفه ( المحلول المركز )

B تمثل تركيز المحلول لذي سيستعمل في التخفيف

فإذا كان ماء فإن B في هذه الحالة تساوى صفراً

W تمثل قوة المحلول المطلوب تحضيره

Y تساوى طرح W من A

X تمثل الفرق بين B و W

يخلط X مل مأخوذ من المحلول A مع Y مل مأخوذ من المحلول B للحصول على التركيز المطلوب .

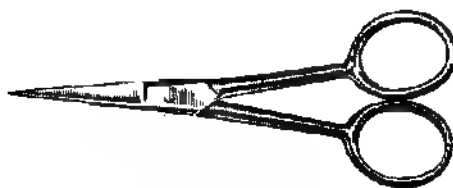
(٤) تحضير لسريجات المختلفة من كحول الإيثايل يخفف كحول الإيثايل ٩٥ : بالماء المقصر ولا يجب استعمال الكحول المطلق في تحضيرها لغلو ثمنه ، ويمكن تحضير التركيزات المختلفة بالطريقة السهلة لسريجة الآتية ، يصب كحول الإيثايل ٩٥ / في

مخبر مدرج حتى يصل الحجم إلى رقم النسبة المطلوبة ثم أضف ماءً مقطرًا إلى المختار ، حتى يصل الحجم إلى النسبة الأصلية من الكحول المستعمل أي ٩٥ / ١ . فإذا أردت أن تحصر كحول ٥ / ١ ، صب ٥٠ مل من كحول ٩٥ / ١ في مخبر مدرج ، ثم أضف ماءً مقطرًا إلى الكحول حتى يصل الحجم إلى ٩٥ مل ، وبذا يتكون كحول قوته ٥٠ / ١ ، وإذا أردت تحضير كمية أكبر من كحول ٥٠ / ١ حافظ على النسبة بين الماء المقطر والكحول ٩٥ / ١ ويؤخذ دائمًا حجم من كحول الإيثانول ٩٥ ٪ يمثل التركيز المطلوب ويستكمل بـ الماء المقطر إلى ٩٥ مل

(٥) لزيتول لا يختلط بالماء ، لذا يجب عند تحضير التركيزات المختلفة من لزيتول استعمال الكحول المطلق . أضف الكحول لمطلق إلى الزيتول مباشرة بالنسبة المطلوبة فمثلاً ٧٥ ٪ زيتول تحصر بأخذ ٧٥ مل من الزيتول وضافة ٢٥ مل من الكحول لمطلق إليها ، ٥ / ١ زيتول تحضر بأخذ ٥ مل زيتول + ٥ مل كحول مطلق وهكذا



مقص ذراعاه ملتصقتان



مقص مدبب الطرف



ملقط مدبب مستقيم الطرف



ملقط مدبب ملتوي الطرف



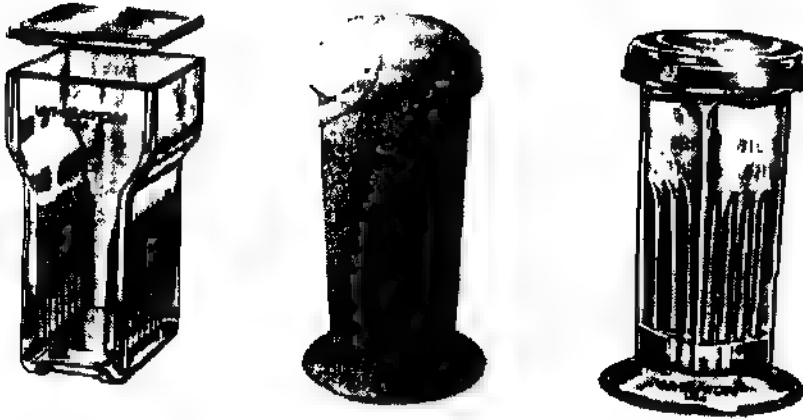
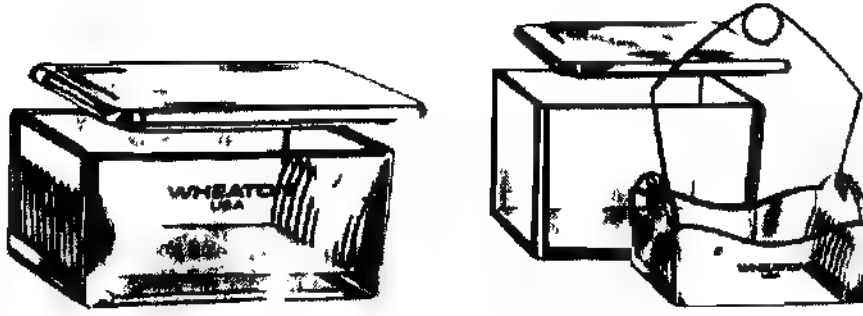
إبر تشريح



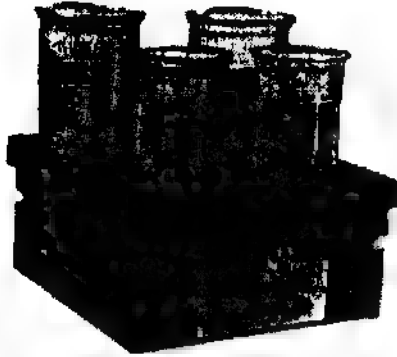
أشكال مختلفة للأمواس

مشرط

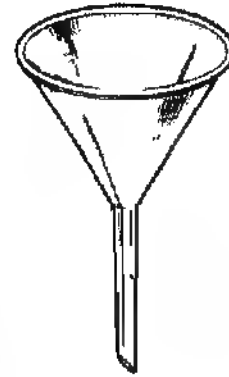
شكل ( ١ ) : بعض أدوات التشريح .



أشكال مختلفة لأحواض الصنع Coptin jars



Hot plate مسطح ساخن



Funnel قمع

شكل ( ١ - ٢ ) . بعض الأدوات الزجاجية والأجهزة المطلوبة بالمعمل .

## جمع وتجزئة العينات النباتية

### Collecting and Subdividing Plant Materials

يتطلب تحديد لمنصقة التى يحرى عمل قطعات بها دقة ومهارة تقوم إلى جانب العلم على اخبيرة والممارسة لعملية ، وتعبر هذه المرحلة على جانب كبير من الأهمية ، حيث تتوقف عليها النتائج التى يتحصل عليها اندارس والتى لايجنى ثمارها ويتحقق من توفيقه فيها إلا عند فحصها مجهرى ، وهى خطوة الأخيرة التى يصل إليها بعدم يكون قد بذل من الجهد الكثير ، وتوضح الأشكال ( ١ - ٣ ) و ( ١ - ٤ ) و ( ١ - ٥ ) و ( ١ - ٦ ) طرق الحصول على العينات من لأجزاء المختلفة للنبات ، وفيما يلى بعض النقاط التى يجب على المدرس اتباعها حتى يحقق أفضل النتائج :

- (١) يجب أن تكون العينات غصة مطابقة تماماً للنوع أو الصنف النباتى المراد القطف فيه .
- (٢) عدم إحداث أى ضرر للعينه عند إحضارها ، سواء كانت نباتات بأكملها أو جزءاً من نبات
- (٣) إذا لم يكن من الميسور أخذ لنماذج وقتلها فوراً فيجب حفظ العينات ونقلها معناية ؛ بحيث لا تتعرض للهرس أو الجفاف أو التعفن ، أو على الأقل إقلال هذه الأضرار إلى حد كبير . ويجب عدم استعمال أنسجة تالفة إطلاقاً إلا إذا كانت مصابة بمرض ، ويراد دراستها من الناحية المرضية .
- (٤) يجب معناية تماماً بعسيل لعينات والاستعانة بفرشاة ناعمة ، لإزالة ما بها من أتربة ، وذلك قبل البدء فى تجزئتها وأخذ العينات المراد دراستها ، ويستحسن تركها فى حوض به ماء لمدة من الزمن ؛ حتى تستعيد العينات بصارتها .
- (٥) يجب استعمال شفرات الخلاقة الحديثة فى تجزئة العينات لرفع حافتها وحدتها ، وبذا نقل لأضرار التى قد تنتج عند استعمال آلة قاطعة سميكة الحافة مثل اسكين أو مقص التقليم ، وإذا تعدد القطع لصلابة لعينة . . . . . فيمكن التحايل بأشفرة ، وذلك بعمل مجرى أعمق فأعمق حتى يتم لقطع .
- (٦) يجب عدم ضغط أو هرس لعينة أثناء تجزئتها ، وكذلك عدم جفافها حتى لا يتلف الكامسيوم واللحاء وكذلك القشرة إذا كانت غصة أو حديثة وكذلك الكامسيوم الفلبى .

(٧) يستحسن أن توضع الأجزاء المنتخبة من العينة والمرد القطع فيها لمحصن تركيبها فى طبق بترى به ساء ؛ لإعادة تنظيفها قبل تجفيفها ونقلها نهائيا إلى محلول القتل والتثبيت . لانتضع الأجزاء وهى مبتلة بالماء فى محلول لقتل ؛ حتى لا يقل تركيزه عما يجب أن يكون عليه ، ويجب نقلها إلى محلول القتل بأسرع ما يمكن .

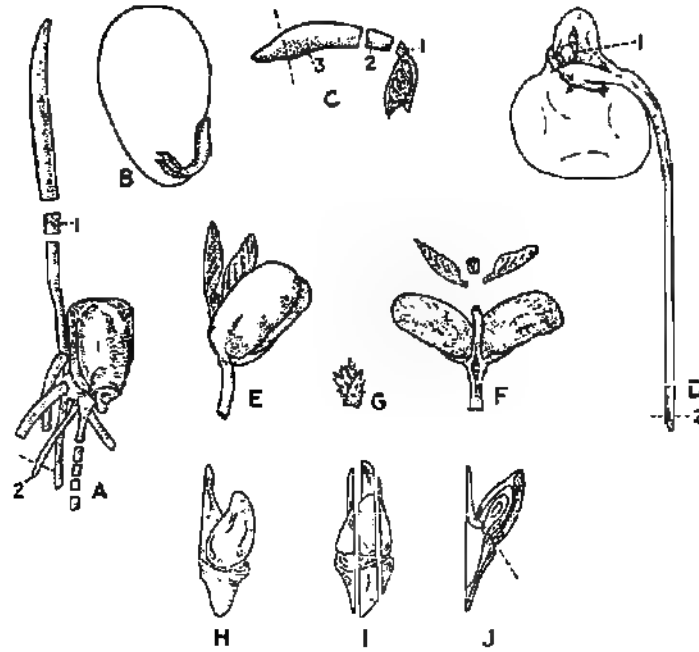
(٨) إذا أردت أن تحفظ العينات بعد إحصارها من الحقل أو الحديقة أو الصوبة لآى سبب يمكن لفها فى ورق ملل داخل إباء مغلق وحفظه داخل ثلاجة ، ويحب عدم تركها مدة طويلة داخل الثلاجة ، لأنها قد تصاب بالعفن وبدا لاتصلح .

(٩) عند تجزئة العينة إلى الأجزاء لمراد معامتها بالمحاليل المختلفة فى العمليات المتتالية . . يجب ملاحظة عمر العينة وتركيبها - فإذا كانت مسمة وجب تجزئتها إلى أجزاء لاتزيد عن ٢ - ٤ مم طولاً ، وبسبك ٥ - ١٠ مم حتى تتخلل المحاليل العينة بسرعة ، أما إذا كانت العينة حديثة السر أمكن تجزئتها إلى أجزاء أكثر طولاً ، قد تصل إلى ١,٥ سم . وفى حالة وجود طبقة سميكة من الكيوتين يجب أن يكون طول الأجزاء أقل ما يمكن ( ٢ - ٤ مم ) حتى يسهل على المحاليل التخلل بسرعة .

( ١ ) يجب عند التجزئة تغيير أحد لأطراف قطع مائل ، لمعرفة الاتجاه عند القطع بالميكروتوم .

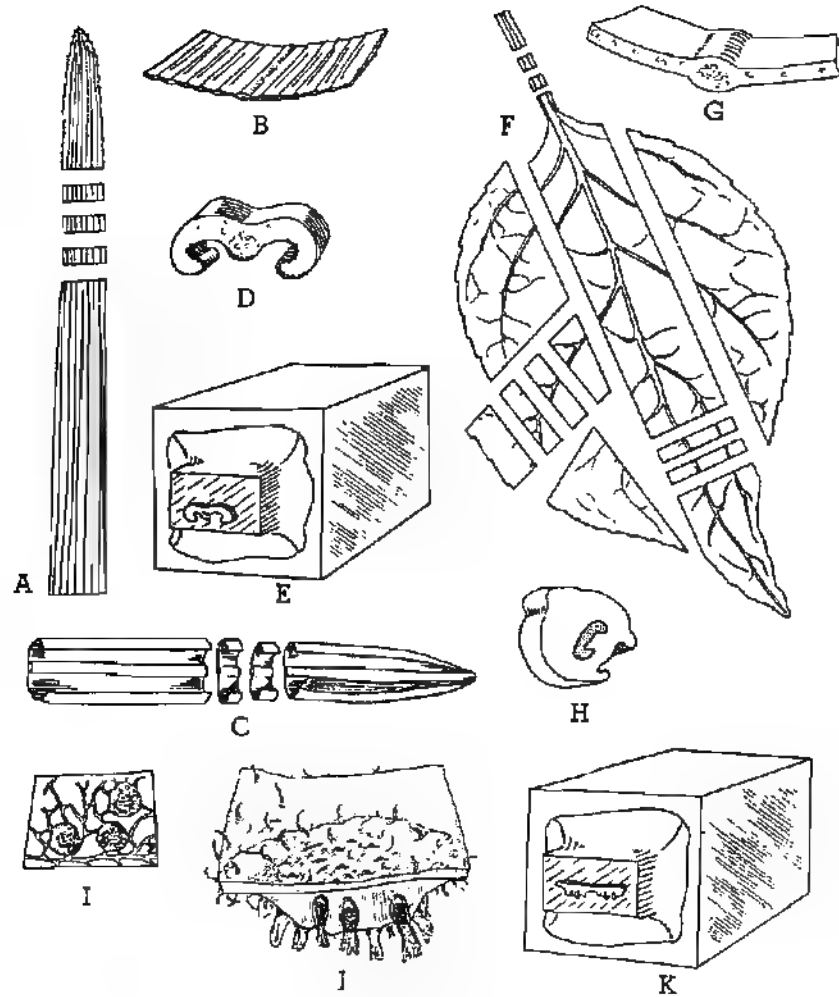
(١١) يحسن إسراع عملية القتل بتفريخ الهواء من العينة بواسطة مضخة ؛ خاصة فى الأجزاء لكبيرة والبراعم والأجزاء التى تكثر البروائد على سطوحها

(١٢) يحب كتابة سجل بالأجزاء لمختدة من العينات ومواضعها وتاريخ أخذها ، وكذلك محلول القتل المستعمل فى العينة وجميع الخطوات المتبعة فى دراستها .

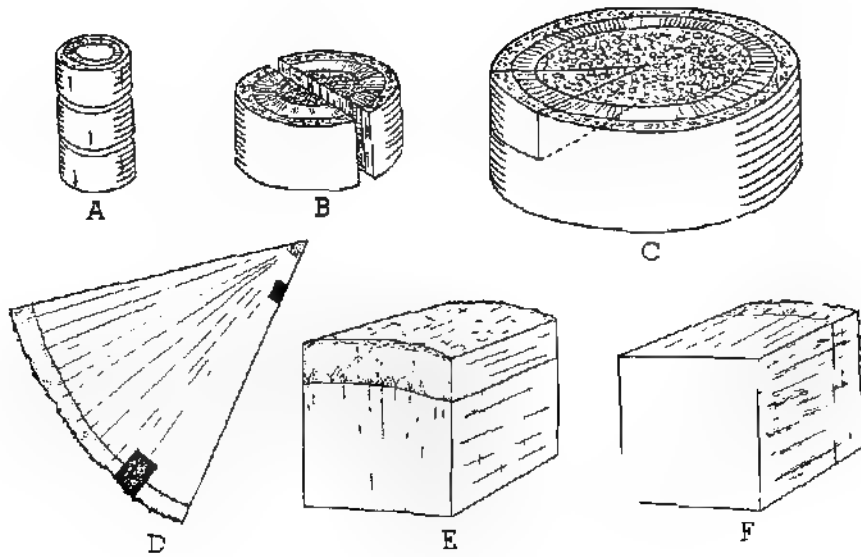


شكل (١ - ٣) : طرق الحصول على لمرستيمات القمية : ( A ) بادرة ذرة حيث تكون القمة النامية للساق لدى عقدة غمد الريشة ( I ) - وتأخذ القمة النامية للجذر من أحد الجذور الجنينية ( ٢ ) - ( B ) صف بذرة فصوليا محتويا على الجنين فى موضعه ( C ) أجزاء الجنين ، ( I ) يشتمل على قمة الساق ، ( ٢ ) تستبعد ، ( ٣ ) يؤخذ منها قمة الجذر ( D ) إنبات البسلة ، تؤخذ القمة النامية للساق من السويقة الجنينية العليا ( I ) - وتوضح ( ٢ ) القمة النامية للجذر - ( E ) و ( F ) إنبات فور لصويا - ( G ) انقمة لنامية للساق - ( H ) و ( I ) و ( J ) الحصول على برعم جانبي لأحد الأفرع ( ساس Sass ١٩٦١ )

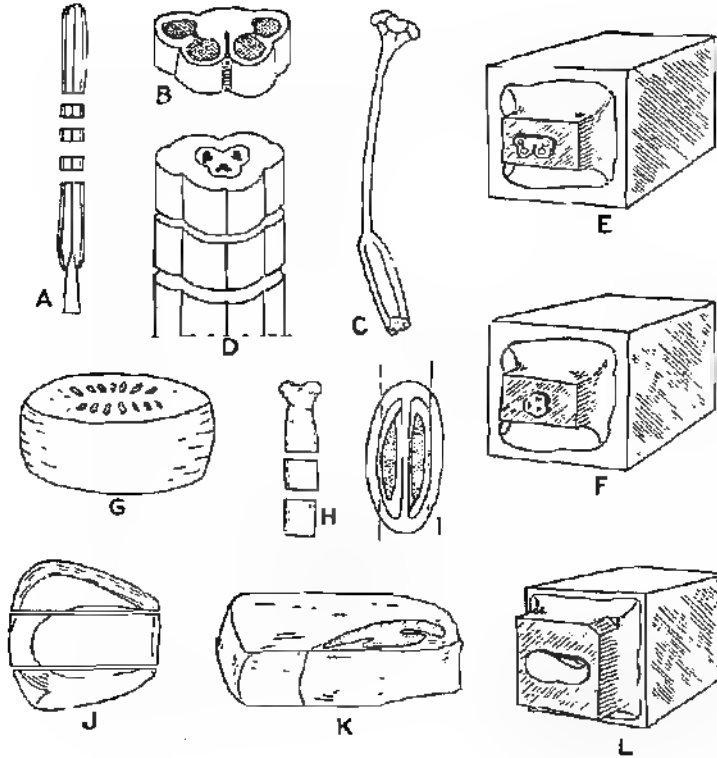




شكل ( ١ ) طرق تحرقه الأورق قبل الترقيد في الشمع يوضح (A) و (B) و (C) و (D) زوايا دات  
نصل طويل وصق وكفه الحصول على قطع عرصه منها (E) جزء من ورقه بعد لترقيد في الشمع والتشيت  
على حامل ميكروتوم - يوضح (F) و (G) و (H) ورقة دات نصل عريض وكفيه الحصول على عينت من  
النصل والعنق (I) جزء من ورقة عليه نموات فطرية (J) جزء مكبر لبشرات جرثومية بزعت من الورقة .  
(K) جزء من ورقة يحمل بشرت جرثومية مطمور في الشمع ، ومثبت على حامل الميكروتوم ( ساس Sass  
١٩٦١ ) .



شكل ( ١ ٥ ) . حرق تجزئة الأعصاب الأسطوانية الصمام (A) و (B) و (C) عبات محتوي على اجزاء تمثل جميع الانسجة في المحور . يوضح (D) وضع لاجزاء الماخوذة من أفرع حشوية كبيرة (E) و (F) الاجزاء المأخوذة من الترع الحشوي مكره - وقد تم تهذيب ( ساس Sdss ١٩٦١ ) .



شكل (١-٦) . تمزقة أعضاء لكثير (A) و (B) مثك لزئق - (C) و (D) مبيض الرسق - (E) و (F) قلب من الشمع للمتك ، و لبيض على حامل الميكروتوم (G) قرص عرصى من شمرة صغيرة للصماطم (H) و (I) ثمره حردية للمشور (J) مقطع طولى لحبة ذرة . (K) الجزء الوسطى للحبة مخنويًا على الأحزاء الرئيسية للحين (L) الحبة بعد اترقيده والتحميل لمحصور على قطاع طوية (Sass ١٩٦١) .

## ٢ . القتل والتثبيت

### Killing and Fixation

تعتبر عملية قتل وتثبيت البروتوبلازم من أهم العمليات في هذا التكنيك . إن عملية إنهاء حياة داخل الخلايا يجب أن تتم بأقل إخلال ممكن بالبناء الداخلي للخلايا . وكذلك أقل تدمير لنظام الخلايا داخل النسيج . بالإضافة إلى قتل البروتوبلازم . . فإن تتابع خطوات عملية القتل يجب أن يعمل على تثبيت العينة والحفاظ على المادة النباتية متماسكة بدرجة كافية لتحمل معها التداول والعمليات المطلوب إجراؤها عليها . وتهدف هذه الخطوة إلى :  
قتل الخلايا فجائيا وتثبيت محتوياتها على حالة أقرب ما تكون من الحالة الطبيعية ، ولا يمكن اعتبار النسيج أصبح مقتولا ما دامت هناك خلية فيه لازلت حية .

### صفات المحاليل المستخدمة في القتل والتثبيت

- (١) أن تكون سريعة الانتشار حتى تتخلل الأنسجة وتقتلها بأسرع ما يمكن .
  - (٢) أن تعمل على تجميد محتويات البروتوبلازم في حالة دقيقة جداً حتى لا يتأثر مظهره بقدر الإمكان .
  - (٣) أن تكسب البروتوبلازم صلابة مناسبة فيتحمل المعاملات المختلفة .
  - (٤) ألا تسبب انكماشاً Shrinkage للبروتوبلازم أو تلف معاملة .
  - (٥) ألا تؤثر في قابلية الأنسجة للصبغات بل يجب أن تساعد عليها .
- والواقع أن ما يفعله التثبيت هو التأثير على بعض محتويات الخلية بحيث يمكن تمييزها عن بعضها تحت المجهر ، أي إنه لو كانت العملية كاملة تمام الكمال في حفظ محتويات الخلية على حالتها الحية ، لأصبحت في الواقع قليلة القيمة لأنها لاتعطى فوارق يمكن تمييزها تحت المجهر بسهولة .

ليس لسائل من السوائل المستعملة كل المميزات السابق ذكرها ، لذا نحضر محاليل تثبيت Fixatives من مادتين أو أكثر تخلط معاً Fixative mixture لتعادل الواحدة تأثير

الأخرى أو تكملها فيصبح للتثبيت في مجموعه كل المميزات المطلوبة أو أغلبها على الأقل .  
فالكحول بمفرده قاتل ومثبت سريع الانتشار ، ولكنه يسبب انكماشاً للبروتوبلازم فيضاف  
إليه حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid ليعادل هذا لتأثير ويمنع الانكماش .

يختلف الوقت اللازم لإتمام عملية التثبيت باختلاف محلول التثبيت وطبيعته وحجم  
النموذج المراد تثبيته ، على أنه من الأفضل كقاعدة عامة ألا تقل مدة التثبيت عن ٤٨ ساعة  
إلا إذا أشير بغير ذلك . ولتثبيت يسق عادة تجهيز القطاعات أو التحضيرات المجهرية  
الأخرى كالسليخ مثلاً ، إلا إنه في بعض الأحوال يحضر السليخ أو القطاع من الأنسجة  
الغضة الحية ثم يثبت بعد ذلك قبل الشروع في خطوات التحضير الأخرى .

### محاليل القتل والتثبيت

فيما يلي عرض لخصائص المختلفة للكيمائيات المستخدمة في عملية القتل والتثبيت  
وأثرها على المكونات المختلفة للخلايا ( ويلي Willey ١٩٧١ ) :

(١) كحول الإيثانول Ethanol

- يحدث تجلط في السيتوبلازم ويجعله كالشبكة الخشنة .
- يتلف الميتوكوندريا .
- يميز لمرج وإتلاف الحبيبات الدهنية في الخلية .
- يحدث انكماشاً للنوية .
- يجعل الكروموسومات غير محددة .
- يحدث انكماشاً واضحاً وتقليصاً كبيراً للخلايا .
- يتوافق مع استعمال حامض الكريك وكلوريد الزئبق ( السليمانى ) والفورمالدهيد  
وحامض الخليك .
- يبين لأكسدة حامض الخليك - ويجب تجنب خلطه مع ثلاثى أكسيد الكروميوم  
وثنى كرومات البوتاسيوم ورباعى أكسيد الأوزميوم .

## (٢) حامض البكريك Picric acid

- له خاصية الانفجار ( ربي ينفجر في الزحاجة ) لذا يجب حفظه فى وسط رطب (مبلل دائماً) .
- يحدث تجلط للسائل اللوى .
- يحفظ الكروموسومات بصورة جيدة .
- يشبت السيترولازم بصورة متجانسة ، ويحدث انكماشاً سيئاً ، ولكنه يترك السيترولازم نصف سائل ( لير ) أى نكماش غير ضرر
- موافق بدرجة عالية مع المثبتات الأخرى .

## (٣) كلوريد الزئبق Mercuric chloride

- سام جداً وقاتل سريع . عند استخدامه بكميات قليلة يسبب التهاباً حاداً للكلى ( ضرر حتى فى التراكيز اقليلة منه ) .
- يحفظ محتويات السيترولازم مثل الميتوكوندريين .
- يحصل النوية واضحة جداً ويثبت الكروموسومات بصورة ضعيفة .
- يشبت لسيترولازم بصورة متجانسة ، ولكنه يحدث له انكماش سيئ .
- يحدث تشوهات فى الخلية بدرجه أقل مما تحدثه لمثبتات الأخرى .
- يحدث اسوداد للنسيج يجب إزالته بفعل اليود فى المحلول لكحولى .
- يجعل الأنسجة أكثر قابلية للصيغ عند تفعله المثبتات الأخرى .

## (٤) ثلاثى أكسيد الكروميوم Chromium trioxide

- عند إذابته فى الماء يعطى حامض الكروميك .
- يجب غسل العينات بالماء الجارى للتخلص منه ، لأن الفيسر بالكحول يساعد أيضاً على اختزاله .
- يحب استعماله فى الظلام ، لأنه مثبت غير ثابت التركيب فى الضوء ، إذا ترك مدة طويلة فى الضوء فإنه يتحول ( يحتزل ) إلى أكسيد الكروميوم الأنخضر الذى يصعب دويانه بدرجة عالية .

- مثبت ممتاز للكروموسومات ولايثبت الميتوكوندريا .
- مسئول عن جعل السيترولارم فى حالة متجلطة حشنة .
- غير متوافق مع المشتات المختزلة مثل الفورمالدهيد وكحول الإيثايل .

#### (٥) الفورمالدهيد Formaldehyde

الفورمالدهيد غاز الفورمالين Formalin عبارة عن محلول غاز الفورمالدهيد فى الماء نسبة ٣٧ - ٤٠ ٪ بالوزن .

- يثبت ويحفظ الميتوكوندريا بصورة جيدة ، كما يقوم أيضاً بحمايتها من فعل حامض الخليث
- لا يستخدم فى تثبيت لعينات الناتية التى سيتم طمرها فى شمع الدرافين ( لأنه مشت ضعيف لهذه العينات ) . أما فى حالة العينات التى سيتم قطعها بالميكروتوم الثلجى أو العينات التى سيتم قطعها بالميكروتوم المرنق فى حالة قطعات اسبليودن فيعتبر مثبتاً جيداً لها ( أى يفصل استخدامه كمثبت لهذه العينات ) .
- لا يوفر الحماية من لانكماش الحد وتحطم لخلايا الناتج عن استخدام تكتيك شمع الدرافين .

#### (٦) رباعى أكسيد لأورميوم Osmium tetroxide

- مثبت جيد فى لحاله العازيه ( عندما يكون فى شكل بخار ) ، ويجب الحذر من تعرض العين والأنف والفم فى هذه الحالة
- نقاذيته دحل الأنسجة ضعيفة ، أى ينحل الأنسجة ببطء ، ولذلك يستخدم فقط مع الأنسجة لرقية أو الرهيفة .
- يحتزل بسرعة فى الضوء ( سهل الاختزال صونيا ) ، ولذلك يجب أن يتم استخدامه فى تثبيت لأنسجه فى الظلام .
- لا يوفر حماية صد انكماش وتلف الخلايا لمثبب عن استخدام تكتيك شمع الدرافين .

- مثبت هام فى الفحص عند استخدام تكتيك المجهر الإلكتروني .
- غير متوافق مع الفورمالدهيد وكحول الإيثانول .

#### (٧) ثانى كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate

- مثبت ضعيف بذاته ، ويسبب نكماشاً كبيراً جداً للأنسجة .
- بعد انقضاء المدة اللازمة للتثبيت يجب أن تُجرى عملية العسير فى الماء الحار ، وذلك مع احترازه إلى أكسيد الكروميك غير القس للذوبان عند استخدام الكحول .
- يجب حفظه فى درجة حموضة أعلى من ٤ ، فعند حفظه فى درجة حموضة أقل من ٤ تكون الأيونات مشبهة لحالة ثلاثى أكسيد الكروميوم .
- يجعل السيتوبلازم والسائل النووى فى حالة متجانسة .
- يحفظ لميتوكوندريا بحالة جيدة ( مثبت جيد للميتوكوندريا ) .
- يسبب انحلالاً جزئياً للنوية
- يجعل الكروموسومات صعبة الرؤية عند لفحص .
- يتوافق مع استخدام حامض ليكريك وكلوريد الزئبق ورباعى أكسيد الأوزونوم .
- يخترل بواسطة الفورمالدهيد وكحول الإيثانول إلى أكسيد الكروميك .

#### (٨) حامض الخليك Acetic acid

- يجب حفظه على درجة حموضة ٤ ، وعند حفظه على درجة حموضة أعلى من ٤ فإن استخدامه على هذه الدرجة يسبب تحللاً للأنسجة مع عدم تثبيتها .
- يسبب تقصصاً شديداً للسيتوبلازم .
- يسبب انحلالاً للميتوكوندريا وجهاز جولجى .
- مثبت ضعيف للسائل النووى . ويثبت الكروموسومات بحالة جيدة
- يتوافق مع المثبتات الأخرى ، إذ خلط مع ثانى كرومات البوتاسيوم بسبب فعل تثبتى مثل لذى يحدثه ثلاثى أكسيد الكروميوم .



جدول (٢) (١) . خصائص مثبتات المجلطة للخلايا Coagulant Fixatives.

كثبات الخصائص	كحول الإيثانول Ethanol $C_2H_5OH$	حامض البكريك Picric acid $C_6H_2(NO_2)_3OH$	كلوريد الزئبق Mercuric Chloride $HgCl_2$	حامض الكروميك Chromic acid $CrO_3$
تركز القس	٩٥ - ٧٠	محلل مائي مشع ٦١٢	محلول مائي مشع ٦٧ - ٦	محلل مائي ٦٥
حسية الأكسدة واختزال	محتبر	مركب	مؤكسد قوي	مؤكسد قوي
التفاعل مع البروتين	محلل قوي	مجلط	مجلط كامل القوة	مجلط كامل القوة يرسبات
التفاعل مع البروتين البروي		يرسب البروتين مع ترك الـ DNA في المحلول	مجلط ضعيف	مشت جيد ومجلط للبروتين القوي
التفاعل مع الدهون	--	--	يكشف نرونيات الدهنية ولايثنها	مشت جيد ومؤكسد
التفاعل مع الكربوهيدرات	--	غير مشت يربط الجليكوجين إلى البروتين	جيد لسكريات العديدة المحاطة	مؤكسد بغير ولكن يور تثبت
معدل التنادية	سريع جداً	بطيء جداً	متوسط	بطيء
حدوث الانكماش	قوي	قوي وبالأخص بعد شمع الدافين	سيئ	متوسط
إحداث التصلب	حاد	يجعل الأسجة أكثر ليونة	متوسط	متوسط
التأثير على الصبغات	غير بسيط	يجعل السيترولازم محباً للحموضة	يجعل السيترولازم قابلاً للصبغات الدهنية والحمضية	يجعل السيترولازم محباً للحموضة بقوة
المسيل	الكحول	الماء أو الكحول	٦٧ كحول إيثانول ومرد	الماء

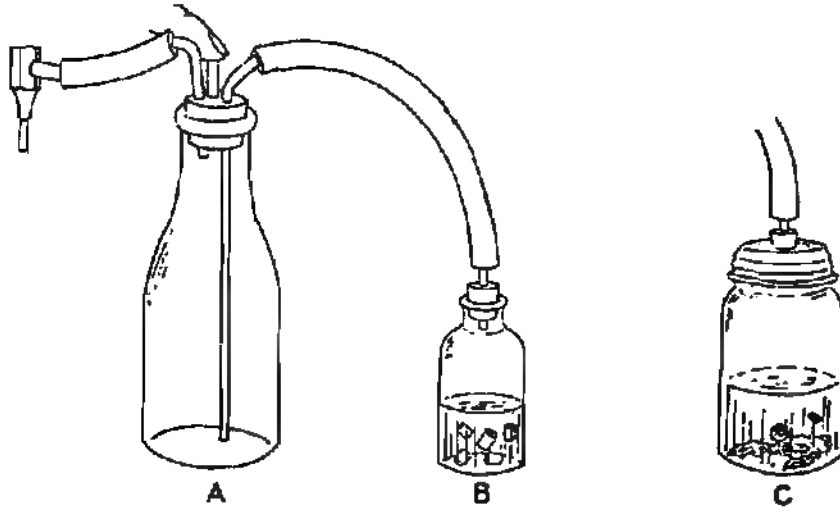
جدول (٢) : خصائص المثبتات غير المجلفة للخلايا Noncoagulant Fixatives .

المثبتات الخصائص	الغورمالدهيد $\text{CH}_2\text{O}$	رباعي أوكسيد الارزيموم $\text{O}_2\text{O}_4$	نيس كرومات البيريسوم $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	حامض الخليك $\text{CH}_3\text{COOH}$
التركيز القياسي	٢.٤ محلول مائي ( ١.١ نـرمالين )	١.١ محلول مائي	١.٥ / ١.٥ محلول مائي	٥.٥ محلول مائي
حاصله الاكسدة والاحتزال	مختزل	مؤكسد	مؤكسد	مؤكسد
التفاعل مع البروتين	غير مجلف ، ثابت ولا يذوب في الماء	غير مجلف	غير مجلف ( عند pH اعلى من ٤ )	يبه البروتين ( يحد البروتين مـب ) ولا يحدث تثبيتاً
تفاعل مع البروتين سووي	--	--	ديـب ار DNA	محبس البروتين السوي
التفاعل مع الدهون	حافظ جيد	صـب	ثابت جيد	عدم تثبيت ويست بعض مـ فـوب
التفاعل مع الكاربوهيدرات	لا يحدث تثبيتاً ويصح على كـر حـر	-	-	-
معدّل بـعدية	موسـف ، در فعل مـفـم	يحبس بـطـه	سريع	مـرـفـع مـبـ
احداث لانكماش	يحدث انكماشات بـطـه اثناء التثبيت ويكماش بعد شـمـع البروتين	مغير قليل	انكماش قـون بعد شـمـع البروتين	انكماشات ، كـمـاش قـون بعد شـمـع مـر فـوب
احداث التصلب	قوي	قوي	صـدـف حـد	صـعـب حـد ويـمـ حدوث التصلب الناشئ في الكـمـر
تأثير على الصـدـب	يحبس بـيـنـيـلـارم مـحـا للـلـوـه	يـجـعـل الـسـيـلـارم مـحـا بـشـويـه	مـتـمـر مع سـجـدة جـدة بـصـدـب حـدـصـبـه	الـسـيـلـارم مـحـا مـحـمـوسـه ، مـكـر مـوسـدـت بـشـويـه
مـصـبـل	--	مـلـاء	--	الـكـمـر

## إجراء عملية القتل والتثبيت

تجمع العينات النباتية لمطلوب عمل قطاعات مستديمة منها ، مع مراعاة الاحتياطات السابق الإشارة إليها ، وتقطع إلى أجزاء صغيرة تناسب العمليات التالية ، وتوضع في أنابيب العينات مغمية لإجراء عملية القتل والتثبيت في الحال . وقد تستخدم زجاجات العينات ولدى تحموى عصى كميات كبيرة نسبيا من محلول القتل ، وخاصة مع المواد الغضة ذات المحتوى للماء العالى أو كبيرة الحجم ، ولدى يمكن أن تحدث تخفيفاً لتركيز المحلول . بعد إجراء العسيل والتحفيف الحرثى يمكن نقل العينات إلى زجاجات أصغر لإجراء باقى العمليات عليها

تكون الثغور والشايات ولتحايف الأخرى لأعضاء لبات محتوية على فقاعات هوائية ، ولدى بدورها تمنع تخيل المحلول بالنسيج والتشيع به . إذا لم تنعمر الأجزاء النباتية فى المحلول مباشرة فيتم توصيل لزجاجات مضخة تفريغ ، ويتم تفريغ الهواء من الزجاجات لمدة قصيرة وعلى مرات متتالية ، حتى يتم غمر أو سقوط كل الأجزاء النباتية فى المحلول ، أو على الأقل تصحح تحت سطح لمحلول إن لم تسقط إلى قاع المحلول . ويتم استخدام زجاجة أمان لمنع لاء من العودة إلى زجاجات لبات كما أن النقر بلطف على الزجاجة يساعد على إخراج فقاعات الهواء . أما العينات الطافية بصيغتها فيجب أن توضع فى زجاجة طويلة ، تحتوى عصى محلول القتل ، على أن تظل مغمورة تحت سطح المحلول بواسطة سدادة من الشاش . هذا ويلزم وجود زجاجة ذات فوهة واسعة وغطاء حلزوى محكم ، من أجل إجراء عملية التفريغ لبعينات الكبيرة ( شكل ٢ - ١ ) عندما تصبح كل القطع لباتية مغمورة بعد انتهاء التفريغ ، ادفع القطع الصافية بعد ذلك ، وستجد أن أغلبها سسقط . قم بعدها بإزالة و ستعد كل القطع التى تطفو بعد التفريغ والدفع .



شكل ( ٢ - ١ ) : إجراء التفريغ لزجاجات العينات المحتوية على محلول القطن .

A - زجاجة أمان مزودة بصمام يدوي

B - زجاجة العينات .

C - زجاجة كبيرة للعينات الكبيرة

العينات التي يوجد صعوبة في تفريغها من الهواء ( العينات الصلبة والشمعية والوبرية والبراعم . . . . إلخ ) لا يتم تخليلها أو تشريبها بالمحاليل تمامًا ، وعلى هذا يجب إعادة تفريغها قرب نهاية خطوات التجهيف ، ويعاد ثانية في المرة الأخيرة لتغيير مذيّب شمع البارافين وقبل إضافة الشمع . قم بتوصيل زجاجة أمان أخرى بين زجاجة الأمان الاعتيادية وزجاجة العينات ؛ وفائدة هذه الزجاجة الثانية هو منع دخول بخار الماء عند إيقاف مضخة التفريغ ، ويتم ذلك بوضع طبقة عميقة من كلوريد الكالسيوم ، وطبقة من القطن في هذه الزجاجة . ويمكن استعمال جهاز تعريغ للفتن ، كما يمكن استخدامه للعمليات التالية لغمر العينات في المحاليل .

## تركيب المحاليل المستخدمة فى القتل والتثبيت Fixative mixtures

### (١) محلول الفورمالين - الخليك - الكحول

#### Formalin - Aceto - Alcohol (F.A.A. Solution)

يعتبر F.A.A. من أحسن المحاليل المستعملة فى القتل والتثبيت ، ويمكن ترك الأنسجة فيه مدد طويلة دون أن تتلف .

وهو من المحاليل المتارة كثيرة الاستعمال لسرعة تخلله الأنسجة النباتية ، ويعتبر المحلول القياسى Standard fixative فى الميكروتكنيك النباتى حيث يفوق استخدامه المحاليل الأخرى - ويحضر كالتالى :

٥٠ مل كحول إيثيل ٩٥ ٪

٥ مل حامض خليك ثلجى

١٠ مل فورمالين

٣٥ مل ماء مقطر

ويمكن أن يحل حامض البيرونيك محل حامض الخليك ، ويرمز للمحلول فى هذه الحالة بالحروف F.P.A. .

يستعمل الـ F.A.A. مع كثير من الأجزاء النباتية مثل الجذور المسنة والسوق العشبية الصلبة والأفرع الخشبية وخاصة إذا كانت الدراسة منصبة على ناحيتى الشكل والتركيب ، كما أنه يوافق الأنسجة المصابة إذا كان الميسيليوم داخلها أما إذا كان الميسيليوم سطحياً فإنه يسبب بلزمة للهيئات الهوائية ، لهذا يستعمل المحلول الماتى التالى الخالى من الكحول الذى يسبب البلزمة .

١٠ مل فورمالين + ٥ مل حامض خليك ثلجى + ٨٥ مل ماء مقطر

هناك تركيبة أخرى أخذه فى الإنتشار وهى إضافة بللورات من السليمانى إلى محلول الـ F.A.A. إلى درجة التشبع to saturation فيصبح المحلول ذو مقدرة على التخلل والتجميد الصلب Penetration and hardening كما أنه يفيد فى دراسة الأنسجة المصابة بالبكتريا ، ويجب ملاحظة عدم حفظ الأنسجة عامة فيه لمدة طويلة تزيد عن أسبوع .

## طريقة الغسيل

تبت لمدة ٤٨ ساعة على الأقل ثم انقل إلى كحول إيثايل ٥٠ / ١ أو ٧٠ / ١ وغير مرتين  
و ثلاث للحلص من حامض الخثيك و الفورمالين ( الغسيل Washing ) ثم بعد ذلك  
استمر في خطوات التجفيف . أما في حالة وجود السليمانى فانقل النماذج إلى المحلول  
الأساسى ( لـ F.A.A. الخالى من السليمانى ) وغيره ثلاث إلى أربع مرات . وبدا يمكن  
الحفظ لمدة طويلة إذا أريد ذلك . وإلا فاتح الخطوات السابقة للتجفيف بعد إزالة  
السليمانى ( أى النقل إلى الكحول ) .

\* لا تغسل العينات بالماء بعد هذا المحلول .

\* مدة القتل والتشيت:

- الأوراق الحديثة . ١٢ ساعة

- لأفرع لفصة : ٢٤ ساعة

- السوق الخشبية . أسبوعين على الأقل

( ٢ ) محاليل كروميك - خليك ( Chrom - Acetic Fluids )

Chromic acid and Acetic acid Mixtures

يوضح الجدول التالى تركيب بعض هذه المحاليل .

محاليل ( كروميك - خليك )					الكيماونت / مليلتر
ضعيف (١)	ضعيف (٢)	متوسط (١)	متوسط (٢)	قوى	
٣	٥	٥	٧٠	٩٧	حامض كروميك ١ /
٧	٥				حامض خثيك ١ /
		١	٢٠		حامض خثيك ١ /
		٤	١	٣	حامض خثيك تلجى ماء مقطر

تستعمل المحاليل الضعيفة للأنسجة الرهيفة والغضة مثل الطحالب والقطريات والحروريات والأطوار الجاميطية للتيريديات والعلبة بالحرزيات القائمة والجزاء المماثلة سهلة التخلل ، أم المحاليل المتوسطة فتستعمل لقمم لتامية ، وتستعمل المحاليل لقوية للعينات الخشبية والأوراق الصلبة .

وتتوقف المدة اللازمة للتثبيت على طبيعة لنموذج وفي حالة الطحالب يكفى بضع دقائق ، أما فى حالة الأجزاء لصغيرة السن مثل الأوراق الحديثة وقمم الجذور فيكفى ١٢ - ٢٤ ساعة أم الأجزاء الكبيرة الحجم فلا تقل المدة اللازمة عن ٢٤ ساعة وقد لوحظ أن دول الكلوروفيل بتكسره من اسطوح المقطوعة وامتداد ذلك إلى داخل النماذج مقياس طيب على سرعة التخلل وإتمام عملية التشيت .

هذه المحاليل لاتصلح لتخزين ( حفظ ) النماذج لأنها تجعل الأنسجة هشة فضلاً عن أنها تعطى نتائج سيئة فى الصبغ إذا مكثت النماذج فيها مدد طويلة ، ولذا يجب إجراء عملية الغسيل والتجفيف بعد مضى المدة اللازمة لإجراء عملية التشيت . وتفصل النماذج بعد قتلها فى هذه المحاليل بالماء جيداً لعدة مرات ، والأفضل أن يتم ذلك بمرار تيار من الماء الجارى . ويجب ملاحظة أن تعامل النماذج بغضة برفق لأن هذه المحاليل لاتسبب تجميد النماذج تماماً ، رغم إنها تقتلها ، أما النماذج المتناسكة فلا يخشى عليها من إمرار تير من الماء أثناء غسلها .

### (٣) محاليل الكروميك - خليك - اوزميك

#### Chromic, Acetic, and Osmic Acid Mixtures

غالباً ما تستعمل المحاليل المحتوية على حامض الأوزميك فى الأغراض السيتولوجية وهى تسبب اسوداد للأنسجة ، لذا يجب أن تجرى لها عملية تبيض Bleaching قبل الصبغ ، والمحاليل المحتوية على حامض الأوزميك ضعيفة الانتشار . ولتبيض النماذج توضع فى محلول ٥ ٪ من فوق أكسيد الأيدروجين حتى يتم التبيض .

وبوصح الجدول التالى تركيب بعض هذه المحاليل :

محاليل ( الكروميك - خليك - أوزميك )					انكيماويات / مليلتر
Taylor	Chamberlain	Flemming			
		قوى	متوسط	ضعيف	
	٩٦	٧٥	٥	٢٥	حامض كروميك ١ ٧
٠,٢					حامض كروميك ١ ١
				١	حامض خليك ١ ١
٢, -			١		حامض خليك ١٠ ١
	٣	٥			حامض خليك ثلجي
١,٥	١	٢٠	١٠	١	حامض أوزميك ٢ ١
٨,٣			٣	٥٥	ماء مقطر
١٥, جم	—	—	—	—	مالتور

يستعمل المحلول القوى من فلمنج فى حالة الأنسجة الصلبة ، أما الضعيف فيستعمل مع الأنسجة الرهيفة . يناسب محلول شميرلين الطحالب الغضة والفطريات الخيطية والكائنات الحية المماثلة ، ولا يصلح للاستعمال مع القمم النامية للجذور أو السوق . يعتبر محلول تيلور من المحاليل المفضلة جداً لقتل عينات الدهك Smears ويحقق نتائج مرضية للغاية لحفظ التراكيب الكروموسومية ، وتؤدى إضافة المالتوز إلى الحفاظ على هيئة التوابع Satellites وعدم طمس الاختناقات بها .

تتوقف المدة اللازمة للتثبيت على طبيعة النموذج ، ففي حالة الطحالب يكفى بضع دقائق ، أما فى حالة الأجزاء الصغيرة العمر مثل الأوراق والقمم النامية فيكفى لها ١٢ ساعة ، أما الأجزاء الكبيرة العمر فيلزم لها مدة لا تقل عن ٢٤ ساعة .

لا تصلح هذه المحاليل لتخزين العينات النباتية لأنها تجعل الأنسجة هشة فضلاً عن أنها تعطى نتائج سيئة فى الصبغ إذا مكثت النماذج فيها لفترة طويلة ، ولذلك يلزم إجراء عملية التجفيف بعد انقضاء الفترة اللازمة لإجراء عملية التثبيت



وتغسل العينات الباثية بعد قتلها في هذه المحاليل جيداً بالماء عدة مرات ، ويفصل الماء الجدرى مع العناية بمعاملة لعينات الغضة رفق .

#### (٤) محاليل الكروميك - خليك - فورمالين

#### Chromic, Acetic, and Fomaldehyde Mixtures

يوضح لجدول التالى تركيب هذه المحاليل :

مجموعة كراي - برين Allen - Bouin	I	II	III	Bouin	مجموعة نافاشين ( كراف ) Nawaschin type Craff						الكيمياء / ملليتر
					V	IV	III	II	I	نافاشين	
٢٥	٥	٤			٥	٤٠	٣	٢	٢	٧٥	حامض كروميك ١
									٧٥		حامض خليك ١
١		٢			٣٥	٣	٢	١			حامض خليك ٢
	٥			٥						٥	حامض خليك ثلثي
١	١	١		٢٥	١٥	١	١	٥	٥	٢	فورمالين
٢٥	٣٥	٢		٧٥		٣	١	١٥			حامض نيكوت ( مسحوق )
											ماء مقطر

يضاف الفورمالين قبل الاستعمال مباشرة إلى أى تركيبة يقع عليها الاختيار من مجموعة نافاشين ( كراف ) . بعد مدة تبلغ عدة ساعات قليلة من إضافة الفورمالين إلى مخلوط حامض الكروميك وحامض الخليك نجد أن المحلول قد تغير ، وبعد عدة أيام يصير لون الكروميك زيتونيّ أو أخضر ، قبل الوصول إلى هذا اللون تكون عملية القتل قد تمت ، وتصبح وظيفة هذا المحلول المتغير قاصرة على تصلب الأنسجة وحفظها ، ويمكن حفظ الأنسجة في هذه المحاليل ما يقرب من ٥ سنوات مع محافظتها على إعطاء تحضيرات هيستولوجية ممتازة . وأقل مدة للقتل في هذه المحاليل [ مجموعة نافاشين ( كراف ) ] هي ١٢ ساعة ، ويستحسن ترك النماذج لعدة أيام لتكتسب الأنسجة صلابة Hardening ، دون خوف من أى تشويه قد يحدث للأنسجة أو اسوداد فى اللون .

يعتبر محلول برين Bouin ممتازاً فى قتل قمم الجذور خاصة فى الطور النهائى لانقسام الخلية الذى يعرف بالطور النهائى Telophase ، كما يستعمل بنجاح فى دراسة الاكياس الجنينية Embryo sac . وهو محلول ثابت ويمكن تجهيزه بكميات مناسبة للاستعمال

بالمعمل أو الحقل وأقل مدة للقتل فى هذا المحلول هى ١٢ ساعة للأجزاء الرهيفة ، أما الأنسجة البالغة فلا تقل المدة عن ٤٨ ساعة .

هذا المحلول لا يصلح لحفظ النماذج لذا يجب عقب أن تنقضى المدة اللازمة للقتل غسل النماذج فى كحول ٢٠ أو ٥٠ ٪ أو يتم الغسيل فى الأسيتون ، ولا يجب أن تتم عملية الغسيل فى الماء . وعقب الغسيل يجب الاستمرار فى عملية التجفيف .

ينتج عن إضافة حامض الكروميك ( فى بعض الحالات يضاف مع حامض الكروميك يوريا ) إلى محلول بوين Bouin المحلول المسمى ألين - بوين Allen - Bouin ، وهذا المحلول يستخدم فى الأبحاث السيتولوجية ، ويجب إضافة الفورمالين قبل الاستعمال مباشرة ، ويصلح هذا المحلول لحفظ النماذج إلى عدة أشهر ، ومن المحتمل أن يتم تصلب النماذج فى هذا المحلول فى مدة تقل عن أسبوع .

#### (٥) محلول كارنوى Carnoy's Fluid

يتركب من

١٠ مل حامض خديك ثلجى

٦٠ مل كحول مطلق

٣٠ مل كلوروفورم

يتميز هذا المحلول بقدرته الفائقة على الانتشار حيث يتخلل الأنسجة بسرعة كبيرة ، لذا يمكن استعماله للنماذج الصلبة والشحمية والورنية التى يصعب انتشار المحاليل الأخرى فيها ، كما يستعمل فى تثبيت الأجسام الحجرية Sclerotia عند فحص تركيبها التشريحي . يتم القتل مباشرة أو بعد ١٠ دقائق على الأكثر إلى كحول مطلق حيث تغسل فيه العينات تغيير الكحول عدة مرات ، حتى يزول كل أثر لرائحة الكلوروفورم وحامض الخليك ، يتم الترويق فى لزيلول ثم الترقيد فى شمع البارافين .

\* تجنب استعمال هذا المحلول عند اختبار لدهون لأن الكلوروفورم يذيبها .

تعطى المحاليل سابقة الذكر « تثبيت حامضى الأثر » مما يحافظ بصورة جيدة وعلى وجه الخصوص على الكروموسومات ، والنويات ، والتركيب المغزلى . بينما يتم تحلل كل من

لميتوكوندري و لبلازما لنوية Nucleoplasm وينم حفظ السيوبلازم بشكل حبيبي .  
وتعتبر هذه الصورة هي المفضلة لأغلب الدراسات الخاصة بتركيب البهات .

في بعض الدراسات لستولوجية يكون المطلوب الحفاظ على الميتوكوندري والبناء  
السيوبلازمى المصاحب . في مثل هذه الحالات يستخدم محلون قتل يعطى « تشييتاً قلوياً  
الاثري » . مثل هذه المحاليل تحفظ الميتوكوندريا واسلاما لنوية وفي بعض الحالات تحفظ  
لنويات والمجوات لنوية بينما يتم تحليل التركيب المغزلى والكروماتين . ولإجراء دراسات  
دقيقة في هذا المجال الستولوجى فعلى الباحث أن يتكرر لنفسه تكييكا خاصاً مبنياً على  
دراسات موسعة من المراجع . وعلى أية حال يمكن عمل شرائح تظهر فيها الميتوكوندريا  
بصورة مرضية لأغراض التعليم باستخدام تعديل (Zirkle's) لمحلل (Erlki's)

Zirkles' modification of Erlki's fluid.

ويتركب من

٠ ٤ مل ماء مقطر

٢,٥ حم سيكرومات الموناسيوم

٢,٥ حم سيكرومات لأمويوم

٢,٥ جم كبريتات لنحاس

يتم لتشييت لمدة تتراوح بين ٢٤ - ٤٨ ساعة ، ثم انغسيل في الماء ، ثم اسحقيف  
والترقيد في شمع البرافين

تعتبر المصطلحات المستخدمة لندلالة على محاليل القتل ملائمة جداً لإعطاء تعليمات  
سواء كتب شفوية أو مكتوبة ، وكذلك لتسجيل تسلسل خطوات العمل . وإطلاق سم  
سالم على مجموعة من المحاليل التي اشكرها لا يعتبر دائماً كفيلاً لتعريفها ، وذلك لأن  
موصفات المركب لابد وأن تختلف باختلاف العينات . وتعريف المركب برقم أيضاً لايعتبر  
وصفاً كفيلاً . لا من خلال مجموعة من العدماء المرتطين معاً والعرض من المصطلح هنا أن  
يكون مشملاً على :

(أ) نوع المركب ويشار إليه عن طريق اسمه أو اختصاره .

(ب) مواصفات المركب ، ويشار إليها بنسب مئوية .

فمثلاً مواصفات مادة صلبة مثل حامض الكروميك يشار إليها كنسبة مئوية بالوزن ، والسوائل مثل حامض الخليك الثلجي السائل فيشار إليه كنسبة مئوية بالحجم . وعلى سبيل المثال فإن أحد مسميات محلول ( الكروميك - خليك ) هو  $[C-A 0.5 - 0.5]$  وتعني ٠,٥ ٪ حامض كروميك وزناً ، و ٠,٥ ٪ حامض خليك حجماً . أحد محاليل تركيبة Nawaschin (Craf) هو  $[Craf 0.2 - 1.0 - 10.0]$  ويعني ذلك أن المحلول يحتوى على ٠,٢ ٪ حامض كروميك و ١ ٪ حامض خليك و ١٠ ٪ محلول فورمالدهيد تجارى . وأحد مركبات Allen - Bouin يعرف بـ  $[A-B 0.2 - 4.0 - 10.0 - 25.0]$  ، وهو يحتوى بالإضافة إلى محتويات (Craf) على محلول مائى مشبع من حامض البكريك ٢٥ ٪ حجماً . يعتبر النظام السابق للمصطلحات الخاصة بمحاليل القتل دقيقاً وجيد للوصف وملائماً ، ويستخدمه المبتدئون والمتخصصون بنجاح .

### محاليل حفظ النماذج النباتية

كثيراً ما يحتاج الأمر إلى حفظ الأنسجة والنماذج المعدة للفحص إلى فترة طويلة لحين الحاجة إلى استعمالها . وأكثر محاليل الحفظ استعمالاً الكحول والفورمالين .

١ - الكحول : يستعمل عادة كحول ٧٠ ٪ ، توضع فيه النماذج بعد تثبيتها وترك لحين الحاجة إليها ، ويستعمل كحول ٨٥ ٪ للنماذج الرقيقة اللينة ، فإن ذلك يساعد على تصلبها وجعلها أصح للقطع .

٢ - الفورمالين : يستعمل عادة ٥ ٪ فورمالين وهو محلول جيد للحفظ ، وأصلح من الكحول عند حفظ النماذج مباشرة بعد جمعها ، دون تثبيت فإنه قاتل ومثبت لا بأس به .

٣ - الفورمالين - كحول : من أجود محاليل الحفظ ويفضل كثيراً عن استعمال أيهما منفرداً ، ويحضر بالنسب الآتية .

٢ مل فورمالين + ١٠٠ مل كحول ٧٠ ٪

أو ٥ مل فورمالين + ١٠٠ مل كحول ٥٠ ٪

٤ - الجلوسرين - كحول: يستعمل لحفظ النماذج التي يخشى عليها أن تتقصف أو تنصب عند التحضير ، ويتكون من :

٥٠ مل جلوسرين + ١٠٠ مل كحول ٥٠ ٪

### ٣ . التجفيف ( طرد الماء )

#### Dehydration

يجب بعد عملية الغسيل إزالة كل أثر للماء وهو ما يعرف بالتجفيف ، وتساعد هذه لعملية بدورها في لغسيل ، وتجمع الأسحة متماسكة ، ويحتمل أن تصح صلة هشة .  
وتتم هذه لعملية معاملة المواد بتركيزات متزايدة من الجوهر لكشاف ، الذي يصرده ،  
ويتركيزات متناقصة من الماء حتى يصل تركيز الجوهر لكشاف إلى ١٠ ٪ ؛ أي  
التخلص تمامًا من الماء .

وهناك طريقتان لتجهيز النماذج بطرد الماء وتحضيرها للتشريب بالشمع

هما :

الأولى : استعمال كيمائيات لطرد الماء عبر مديّة للشمع ، ثم بعد ذلك استعمال كيمائيات  
أخرى مديّة للشمع تعقب الأولى فيما يسمى بعملية الترويق Clearing .

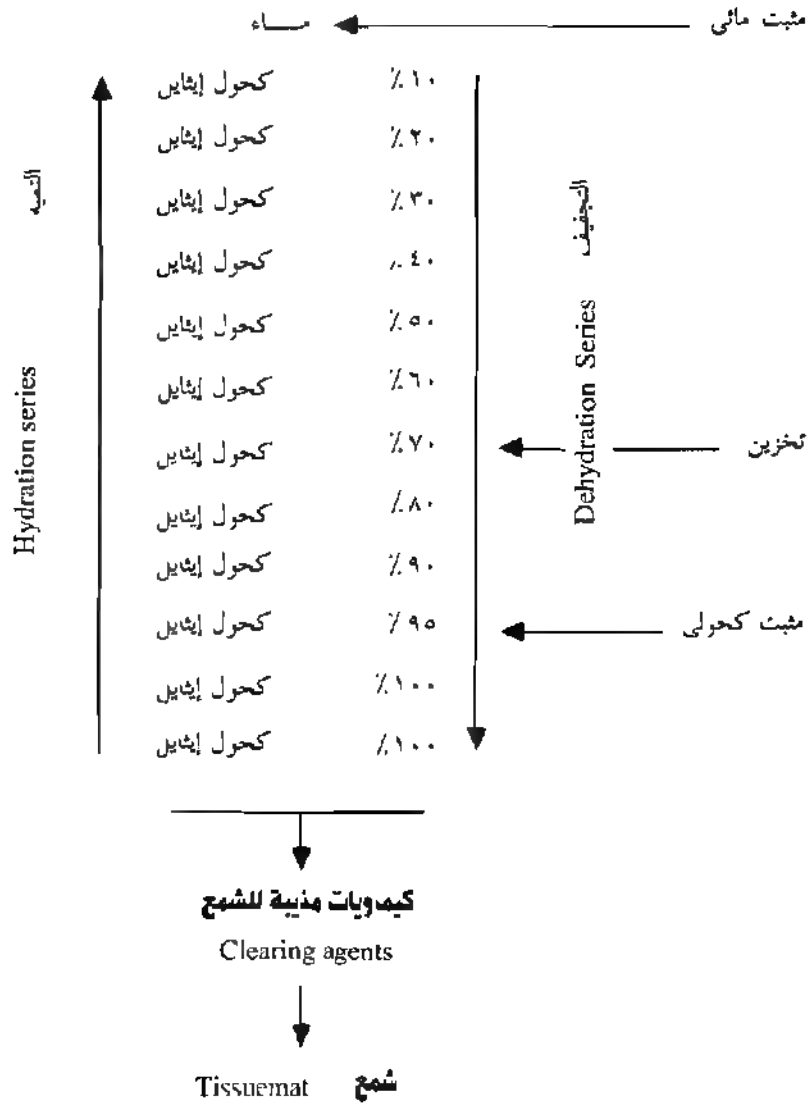
الثانية . استعمال كيمائيات بطرد الماء وفي الوقت نفسه تذيب الشمع .

#### أمثلة للطريقة الأولى لطرد الماء :

حيث ستعمل كيمائيات تصرد الماء بكن لاتذيب الشمع مما يتطلب بعد ذلك استعمال  
كيمائيات أخرى مديّة للشمع

#### (١) استعمال كحول الإيثايل Ethanol

وهو أهم ما يستعمل في هذه الطريقة ، ويمكن أن يحل محله كحول الأيزوبروبيل  
Isopropyl alcohol ، وتتم هذه العملية بعمل تركيزات من الكحول متدرجة كالآتي :  
١٠ ٪ ، ٢٠ ٪ ، ٣٠ ٪ ، ٤٠ ٪ ، ٥٠ ٪ ، ٦٠ ٪ ، ٧٠ ٪ ، ٨٠ ٪ ، ٩٠ ٪ ،  
٩٥ ٪ حتى يصل إلى ١٠٠ ٪ وهو الكحول المطلق ، وقد تكون خطوات أكثر تقاربًا من  
ذلك ، أي سمارق ٥ / فقط بين كل تركيز وأخرى ويوضح المخطط ( شكل ٣ - ١ )  
سلسلة الخطوات لمتعة في هذه الطريقة .



شكل ( ٣ ١ ) : مخطط يوضح خطوات لتنجيف بواسطة تركيزات متدرجة من الكحول

ويجب مراعاة تحضير هذه المحاليل حتى تكون معدة عند الطلب ، وتتم عملية العسيل بالماء أو الكحول حسب محلول لقتل المستعمل ، ويجب عند إخراء عملية طرد الماء أن تبدأ بالتركيز الذي يطابق تركيز محلول العسيل ، فإذا غسلنا بالماء بدأ بأول تركيز

للكحول ، وهو ٥ ٪ أو على الأكثر ١٠ ٪ ، أما إذا تم الغسيل بالكحول قوة ٥ ٪ إذا كان محللول القتل F.A.A. فنبداً عند التجفيف بتركيز لكحول ٧٠ ٪ .

ويجب أن تتم عملية لتجفيف بسرعة ، وألا ترك النماذج لتجف خاصة في التركيزات العالية لقدرتها السريعة على لتطير ، ويجب ملاحظة أن يتم التغيير لكل ثبوتة على حدة ، والمدة التي تنقضي بين كل تركيز وآخر تتوقف على حجم وطبيعة لمودج ، وعلى مدى قابلية الجوهر الكشاف السابق معاملة النمودج به للدوبان في المحاليل المستعمدة لتجفيف .

وفي حالة قمم لجذور أو الأجزاء الغضة من الأوراق يكفي ٣٠ دقيقة بين كل عملية تغيير وأخرى حتى نصل إلى تركيز ٧٠ ٪ ، ولكن إذا احتوى محللول القتل على حامض البكريك فأطل المدة إلى ساعة ، وإذا كانت لنماذج خشبية صلبة ومقتولة في محللول F.A.A. فأطل المدة من ٤ - ٨ ساعات حتى نصل إلى تركيز ٨ ٪ ، وتضاعف المدة إذا كنت النماذج كبيرة الحجم .

#### ويجب مراعاة ما يلي :

(١) ضاعف المدد السابق ذكرها بعد أن نصل إلى ٧٠ ٪ كحول في التركيزات التالية لذلك .

(ب) يجب تغيير السدادات عندما نصل إلى تركيز ١٠٠ ٪ أي كحول مطلق ، وغير فيه أكثر من مرة لأنه المرحلة الأخيرة لطرد الماء .

(ج) يجب ألا تغسل النماذج أكثر من اللازم في الماء ، كما يستحسن أن تتم عملية التجفيف في تركيزات متقاربة القوة حتى لا تحدث بلزمة أو تشويه في بعض الخلايا .

(د) تلافى ترك النماذج مدد طويلة أكثر من اللازم في تركيزات الكحول العالية والحالية من الماء ، حتى لاتتغير النماذج هشّة أو يحدث انكماش في الأسجة .

#### (٢) استعمال الأسيتون Acetone

يعتبر الأسيتون ممتازاً في إجراء عملية التجفيف ، ويوجد على حالتين : الحالة الأولى وبه نسبة بسيطة من الماء ويستعمل في تحضير التركيزات المتتالية ، أما الحالة الثانية فهو



الخالي من الماء Anhydrous وتجري به عملية التعيير الأخيرة أكثر من مرة للتأكد من طرد الماء تمامًا كما في حالة الكحول المطلق .

يتبع في هذه لحلة نفس الخطوات التي اتبعت في حالة كحول لإيثايل بنتركيزاته . ومن الممكن أن تنقل السماذج من تركيز ما للكحول إلى ما يماثله من الأسيتون دون حدوث أى ضرر ، كما يمكن أن تنقل السماذج المقتولة في محاليل قتل ، لها تركيز حصص من الكحول إلى لأسيتون ، دى نفس التركيز ، أى نفس نسبة الماء في كل منهما

### (٣) استعمال الجلسرين Glycerine

يستعمل الجلسرين في تجفيف السماذج لرهيفة كالطحالب ، وارتفاع درجة غيائه تساعد على طرد الماء بواسطة لتبخير ، ولذا تتم هذه العملية ببطء ، لتلافي السلزلة إلى حد كبير نتيجة للتدرج البطيء في تركيز الجلسرين ، ويجب أن تغسل السماذج في الماء جيداً ( لأنها مقتولة في محاليل الكروميك - خليك ) وذلك لأن الجلسرين وتبخر الماء بالتدريج لايزيل أثر البقية لباقية من محاليل القتل من الأنسجة إن وحدث .

ضع السماذج في محلول جلسرين قوته ٥ 7 ، ويجب أن تكون كمية السائل كافية بحيث يتبقى بعد التبخير ما يكفى من الجلسرين لتغطية السماذج ، ويمكن أن تتم العملية بوضع السماذج داخل مجفف على درجة حرارة لغرفة ، أو في فرن درجة حرارته ٣٥ - ٥٤ م ، إذا تغير لون الجلسرين فغيره بآخر من نفس التركيز ، ولتقدير ذلك يجب أن يعين ارتفاع السائل عند الابتداء ، فإذا صار ارتفاعه نصف ما كان قبل التبخر فمعنى ذلك أن قوة تركيز الجلسرين أصبحت ١ ٪ وهكذا . بعد تبخر كل الماء تقريباً تصبح السماذج متماسكة ، وبذا يمكن نقلها إلى كحول مطلق مع تعييره على الأقل مرتين ، استمر في العملية حتى النقل إلى الشمع .

### التزويق Clearing

عقب استعمال أى من الطرق السابق ذكرها لتجفيف ( كحول الإيثايل - أسيتون - الجلسرين ) تنقل السماذج إلى أحد مذيبات الشمع ، وتعرف هذه العملية بالتزويق ؛ وذلك لأن بعض المذيبات للشمع تكسب السماذج شفافية ملحوظة

وامم هذه المذيات ما يلى :

(أ) الزيلول Xylene (Xylol)

(ب) الكلوروفورم Chloroform

(ج) يمكن استعمال الزيل Benzene والتلوين Toluene ولكنهما لا يستعملان غالبًا لانخفاض درجة غليتهما ، وبذا تصبح هناك خطورة من الاشتعال .

وعند استعمال الريلول يجب أن يكون التدرج فى التركيز بطيئًا فى الأبحاث السيتولوجية ويوصى بعمل ١٠ تركيزات ، أم فى الأعراض التشريحية فيكتفى بالتركيزات ١٠ ، ٢٥ ، ٥٠ ، ٧٥ ، ٩٠ ، ١٠٠ / زيلول فى كحول مطلق ، ويكفى من الزمن فى كل تركيز من نصف ساعة إلى ثلاث ساعات على حسب حجم وطبيعة النموذج . ويستحسن أن تطوى المدة فى لتركيزات العالية . ويمكن استعمال نفس التركيزات السابقة من الريلول فى الأسيتون ( النقى )

وإذا ستعمل لكلوروفورم فلتكن لتركيزات كالآتى :

١/٣ كلوروفورم + ٢/٣ كحول مطلق ثم ٢/٣ كلوروفورم + ١/٣ كحول مطلق ثم كلوروفورم نقى وبغز مرة على لأقل ومن يميزاب الكلوروفورم أنه لايجعل النماذج هشة كالريلول . ويمكن الاستعاضة عن الريلول بالمركب ترائى كلورويثيين Thichloroethylene نفس لصريقة السابقة فى الريلول . كما يمكن استعمال ريت السيدر Cedar oil . وهو مروف ممتاز . وتحوى لعملية صبب الكحول لمطلق وبه النماذج على ريت سيدر ، فتأخذ نماذج فى معرض ثم يرب الكحول خاصة . وبعد مدة تعسل النماذج عدة مرات بالزيلول النقى .

أمثلة للطريقة الثانية لطرد الماء :

(١) كحول البيوتاييل Butyl alcohol

يستعمل فى هذه الطريقة كحول البيوتاييل لعدى N - Butyl alcohol أو اثلاثى Tertiary butyl alcohol - وقد أدرجت هذه لصريقة منذ زمن قريب لإجراء عملية لتجفيف والتشريب بالشمع ، وعند استعمال كحول البيوتاييل العادى تعمل التركيزات موضحة فى جدول رقم ( ٣ ١ )

### حدود ( ٣ ١ ) لتركيزات المستعملة من كحول البيوتانيل العادي

لفرد الماء من العينات الناتجة خلال عملية التحضير.

°	تركيز	كحول بيوتانيل عادي مل N. Butyl alcohol	كحول إيثانيل ٩٥ % مل 95 % Ethanol	ماء مطهر مل Distilled water
١	١ / ٣	١٠	٢	٧
٢	١ / ٤٠	١٥	٢٥	٦٠
٣	٧ / ٥٥	٢٥	٣	٤٥
٤	١ / ٧	٤٠	٣٠	٣٠
٥	١ / ٨٠	٥٥	٢٥	٢٠
٦	١ / ٩٠	٧	٢	١٠
٧	١ / (خليط)	٨٥	١٥	-
٨	١ / ١٠ / نقى	١٠	-	-
٩	١ / ١٠ / نقى	١٠	-	-

هذه التركيزات تعطى نتائج ممتدة في الأغراض التشريبية والهندسية . بعد غسل في الماء غمر المادج في تركيزات من الكحول ، حتى يصل إلى تركيز ٣٠ / كحول إيثانيل ومنه تنقل إلى التركيز رقم ١ بالجدول ، وبعد الغسل مرتين في كحول تركيز ٥٠ . إذ كد الفتل في F.A.A. تنقل للمادج إلى التركيز رقم ٣ بالجدول .

يعتبر بعض المشعلين أن الكحول ثلاثي البيوتانيل Tertiary butyl alcohol (T.B.A.) تحسن لجواهر الكشافاة لإجراء عملية لتجفيف على الإطلاق ، وهو ذو رائحة مقبولة وعالى الثمن ، لذلك لا يصح استعماله في أعمال الترويق التي لا تحتاج إلى دقة فائقة . بعد الغسل في الماء أو الكحول غمر المادج في تركيزات من الكحول متدرجة ، حتى يصل إلى ٥٠ / كحول إيثانيل ، ثم بعد ذلك تتبع الخطوات الموصحة بالجدول رقم ( ٣ ٢ )

## جدول ( ٣ - ٢ ) : التركيزات المستعملة من كحول ثلاثي البيوتانيل

لطرود الماء من العينات ابتيية خلال عملية التجفيف .

م	درجة التركيز	كحول ثلاثي T.B.A البيوتانيل مل	كحول إيثانيل ٩٥ % 95 % Ethanol مل	ماء مقطر Distilled water مل	كحول مطلق Absolute Ethanol مل
١	٦ %	١	٥	٤	--
٢	٧ %	٢٠	٥	٣	--
٣	٨٥ %	٣٥	٥٠	١٥	--
٤	١٠ %	٥	٥	--	--
٥	١٠ %	٧٥	--	--	٢٥
٦	١ %	١	--	--	--
٧	١ %	١٠	--	--	--

## (٢) الديوكسان Dioxan

يكثُر استعمال الديوكسان في عملية التجفيف ، وهو سهل الاختلاط بكل من الماء ؛ حيث يحل محله في الأنسجة وكذلك شمع البارافين وبالتالي يعطى نتائج تشرب طيبة ، وهو لا يحدث بلزمة كالتي تحدثها الكحولات أو الأسيتون ، كما لا يجعل الأنسجة هشة . Brittle

وترجع أهمية الديوكسان لما يوفره من وقت ؛ إذ يمكن ترقيد الأنسجة في الشمع بعد نحو ٤ - ٦ ساعات من التثبيت ، حيث تنقل العينات إلى الديوكسان مباشرة من محاليل بومين أو الفورمالين ، وتجري ثلاثة تعبيرات من الديوكسان خلال ٤ ساعات ، تنقل بعدها العينات إلى شمع البارافين ، حيث يتم التغيير فيه ثلاث مرات بين المرة والأخرى حوالى ٣٠ دقيقة .

يؤخذ على الديوكسان أنه يسبب انكماشاً للأنسجة يفوق الزيلول ، كما أن الديوكسان خطر ؛ حيث تعتبر أبخرته ضارة للإنسان ؛ إذ إنها سامة للكبد ؛ ولذلك يجب استعماله داخل حجرة الأبخرة وتخزينه في أوانٍ محكمة الغلق . وعموماً لاتوازي فائدته ما قد ينجم عنه من ضرر .

## ٤ . الطمر ( الصب فى القوالب )

### Molding

#### أولاً : الطمر فى شمع البارافين Paraffin wax embedding routine

عند الوصول بالعينات النباتية إلى الحالة السقية لمذيبات الشمع ، وبعد إزالة الماء بالتجفيف ( والترويق ) تبدأ عملية التشريب والترفيد بالشمع ، ويستخدم لذلك شمع البارافين إما منفرداً أو مخلوطاً بمواد أخرى

ويراعى فى شمع البارافين المستخدم توفر الشروط التالية :

- (١) أن تكون درجة انصهاره ثابتة ومعروفة وصلابته مناسبة ، وتتراوح درجة انصهار شمع البارافين ما بين ٤٨ إلى ٦٢° م ، مع التجاوز عن درجتى حرارة لكل درجة انصهار فمثلاً الشمع الذى درجة انصهار ٤٨° م مثلاً تتراوح درجة انصهاره ما بين ٤٨ - ٥٠° م وهكذا - وعادة ما يستعمل الشمع الذى درجة انصهاره ٥٦ - ٥٨° م ، ويفصل خلال الشتاء شمع درجة انصهاره ٥٤ - ٥٦° م ، وفى الصيف ٦٠ - ٦٢° م .
- (٢) أن يكون متجانس القوام والملمس ، مع أقل ما يمكن من التركيب المتبلور أو الحبيبي .
- (٣) أن يكون نظيفاً خالياً من الشوائب والماء والزيوت الطيارة .

ويمكن تحسين قوام الشمع بمنع التبلور ، وتحسين عملية القطع بإضافة المطاط والشمع الإسكندرانى ( شمع العسل ) إليه ، وذلك بإذابة ٢٠ جم من المطاط الخام إلى ١٠٠ جم من الشمع المنصهر حتى درجة التدخين ، ثم يبرد ويصب على هيئة البلاطة لحين الاستعمال وبعد ذلك يمكن عمل الخليط التالى :

شمع بارافين	١٠٠ جم
خليط المطاط وشمع البارافين ٤ - ٥	٥ جم
شمع العسل	١ جم

ثم يصهر الخلط في الفرن ، ويترك مدة حتى يصير متجانساً ، ويراعى ترويقه إذا وجدت شوائب - وقد يعد الخليط ويباع تجارياً .

\* يستحسن أن يكون لمطاط من النوع يسمى مطاط سيلان Ceylon rubber .

\* يراعى أن تكون درجه انصهار المصط مساوية لدرجة اندخيز في الشمع .

### التشريب في شمع البارافين Infiltration in paraffin wax

ولإجراء عملية لتشريب تتبع إحدى الطرق الآتية :

#### الطريقة الاولى :

توضع عينة الباتيه بعد التحفيف والترويق في رينول جديد ، في أنبوبة ذات حجم مناسب  $5 \times 2$  سم وغطاء فلين ، وتضاف قشور رقيقة من الشمع إلى الريلول حتى يتوقف ذوبد الشمع على درجة حرارة الغرفة وترك ٢ - ٤ ساعات ، ثم تنقل الأنبوبة إلى الغرفة العلوية من فرن الشمع ، وهي العرفة المخصصة لتحفيف الشرئع ، وتتراوح درجة حرارتها بين ٣٥ - ٤٠ م . يضاف مزبد من الشمع على فترات ( كل ساعة مثلاً ) حتى تصبح قوة تركيز لشمع نحو ٥ / تقريباً ، وتترك لمدة ٤ ساعات تنقل لأسفوية إلى فرن الشمع ( ٦٠ م ) دون برع غطائها وتترك ٢٤ ساعة مع إضافة كمية من لشمع ، إذا تطلب الأمر ذلك ( بعد ٦ ساعات مثلاً ) ينزع لغطاء وتضاف كمية أخرى من لشمع وتترك الأنبوبة دون غطاء لمدة ٢٤ ساعة ، حيث يتبخر معظم أو جميع الريلول . يسكب الشمع الذي يعلو العينات النباتية ويضاف شمع نقي وتترك ٢٤ ساعة . يستبدل لشمع النقي مرة أو مرتين ، ويترك في كل مرة ٢٤ ساعة ، بعد ذلك يكون تشريب لأنسجة لشمع تاماً وتصبح العينات معدة للصب (الصمر) في لقواب

#### الطريقة الثانية :

كثافة بعض مذيبات الشمع أقل من كثافة الشمع ، ويدلك تطفو عليه إذا ما أضيفت إلى شمع متجمد ، لكن من الممكن أن يطفو الشمع على كحول البيوتيل العادي NBA أو كحول ليبتايل الثلاثي TBA بإضافة الكلوروفورم بسبة ١٥٪ إلى NBA و ٢٥٪ إلى TBA كما أن كثافة الشمع أعنى من كثافة الريلول ، ولكن يمكن إضافة الشمع مصهراً إلى جدران الأنبوبة فيكون طبقة متماسكة من الشمع على سطح المذيب .

يضاف ما يوازي ملء ملعقة صغيرة شمع سارافين منصهر إلى المذيب النقي ، وهو بارد  
وه العينات النباتية ، فيكون الشمع طبقة متماسكة أعلى المذيب ، وتترك الأنابيب على  
درجة حرارة الغرفة ، ثم تسفل إلى الفرن العلوي ( ٣٥ - ٤٠ °م ) ؛ حيث لا ينصهر  
الشمع بل يذوب ويتشر إلى أسفل حيث العينات لنباتية . إذ ما تم ذوبان الشمع يضاف  
كمية أخرى من شمع منصهر ، وتستمر عملية لإضافة حتى تتكون طبقة من الشمع لا  
تذوب على السطح ، وباستلى يكون المذيب قد تشبع بالشمع على هذه الدرجة . لا تحش  
من تف العينات إذا طالت مدة هذه العملية ٢ - ٣ يوما .

تنقل الأنابيب إلى فرن الشمع ، وبذلك تنصهر الطبقة السطحية المتماسكة ، وتستمر  
عملية التشريب بالشمع ولتى بدأت على درجة ٣٥ °م . بعد مضي نحو ٤ ساعات يصب  
نصف الكمية الموحدة في الأنابيب ، وتستند بكمية مساوية من الشمع النقي ، وتكرر هذه  
الخطوة ٤ - ٥ مرات ، في أنهاية يسكب الشمع المصاحب للعينات . ويستدل بآخر نقي ،  
وتعاد الأنابيب إلى الفرن سريعا ، تكرر هذه الخطوة ٢ - ٣ مرات لتنام التأكد من التخلص  
من كل أثر للمذيب ، وعند تمام التخلص من للمذيب لا يكون الشمع دهى للممس

### الطريقة الثالثة :

تسعمل في حالة عدم إضافة الكلوروفورم إلى كحول البيوناييل العادي أو الثلاثي لرفع  
كثافته ، وتحسرى بنقل السمادح إلى خليط من البيوتيل وريت السارافين نسبة ١٥ /  
لكر . تترك لنمادج فيه على الأقل لمدة ساعة ، ثم يصب من نصف أنوبة بالشمع  
المنصهر وسرك حتى يبدأ الشمع في تسيك ، ثم تسكب سمادح وما عليها من خليط  
على هذا الشمع انتصب ، بحيث تكون السمادج معطاة بالحبيط ، وتترك في جو  
لغرفة العادي ، يذيب البيوتاييل لشمع فتأخذ السمادح في الغوص إلى أسفل سطه ، وبذا  
يحدث لشريب تدريجيا ، ثم تنقل الأنابيب إلى غرفة العلوية من الفرن ، وتترك لمدة  
١٢ ساعة حتى يصبح الخليط والشمع سائلا . تنقل الأنابيب إلى الفرن ، وترفع الأغصية ،  
فيبدأ الكحول في التطاير ويردد تركيز الشمع . بعد ٤ - ١٢ ساعة يستبدل هذا الخليط  
شمع نقي ، وتكرر هذه العملية مرتين أو ثلاث كل ٦ ساعات ، ثم يعمل اختبار مضع  
قطعة شمع للتأكد من روال كل أثر للمذيب .

### التزقيد في شمع البارافين Embedding in paraffin wax

تكبب العينات لثباتية بمحولها من شمع مصهر بعد تمام تشريب العينات بالشمع في قوالب خاصة ، قد تحضر من لورق المقوى ( شكل ٤ - ١ ) ، أو قد تستعمل قوالب معدنية ، وأحياناً تستعمل قوالب لثلج البلاستيك الموحدة مع الثلاث ، كما قد تستعمل زجاجات ساعة بحجم مناسب .

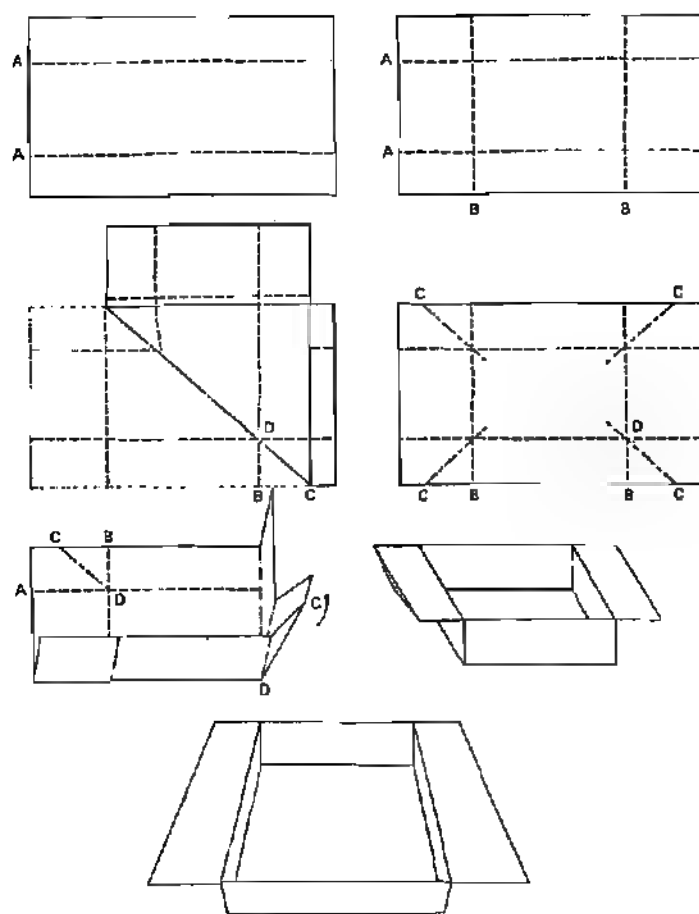
ولإجراء هذه العملية يفصل إضافة طبقة رقيقة من الجلسرين على السطح الداخلى للقلب ، حتى يسهل فصل قوالب الشمع بعد تجمدها . توضع القوالب على سطح ساخن Hot plate ويضاف طبقة شمع رقيقة ، ثم توضع بطاقة بيانات صغيرة مقلوبة بأحد الأركان ، ثم تصب محتويات الأنبوبة من شمع مصهر به لعينات النائية ، ويراعى أن يعطى لشمع العينات ثباتاً وإلا يضاف كمية مناسبة من شمع منصهر ، وتضم العينات فى الوضع المناسب بواسطة إبرة تشرح دافئة ، مع ترك مسافة مناسبة بين كل عينة وأخرى ؛ ليتمكن تجزئة القلب مستقلاً إلى قطع صغيرة ، تحتوى كل منها عينة واحدة للقطع فيها ، ويراعى عدم تصلب لشمع حتى تمام تنظيم العينات .

يبدأ سطح القلب فى التجمد أولاً ؛ حيث تتكون طبقة رقيقة صلبة على لسطح ، ويرفع القلب بعيداً عن السطح الساخن ، ثم يوضع القلب بإناء به ماء بارد ليتصلب . وقد يتطلب الأمر أحياناً إمرار لهب على سطح الشمع للتخلص من أية فقاعات هوائية تتكون داخل الشمع . عند بدء تصلب لشمع يغمر داخل الماء لتمام التصلب ، ويمكن وضع ثقل مناسب فوق القلب

يتماسك الشمع ويصبح بيئة متجانسة نصف شفافة ، أصلح ما تكون لإجراء القطع ، تسرع قوالب الشمع من قوالب لورق ، ويمكن استعمال القوالب الورقية مرة أخرى ؛ حيث إن تشريبها بالشمع يجعلها أفضل للاستعمال حيث يكون سطحها مصقولاً

يراعى ألا يترك الشمع يبرد تدريجياً ، حتى لا يتبلور ويصبح غير صالح للقطع ، ولا يضاف شمع إلا بالقدر الكافى لتغطية العينات ، لأن القوالب لسميكة تكون صعبة التماسك . أصف إلى ذلك الإسراف فى استعمال الشمع وسرعة استهلاك محاليل إزالة الشمع فى الخطوات التالية





How to fold a paper box

شكل ( ٤ - ١ ) : كيفية عمل قالب من الورق المقوى لطمر العينات النباتية في شمع لبارافين  
( ويلبي Willey ١٩٧١ ) .

إذا ظهر أى عيب بالقوالب بعد صبها يمكن إعادة هذه العملية مرة أخرى **Recasting** : حيث تقسم قوالب الشمع إلى قطع نحوى على العينات الستية ، وتوضع فى أنابيب تعاد إلى الفرن مع عمل تغييرتين من الشمع للتخلص من الشمع السابق صبه وتكرر الخطوات السابقة .

قد تظهر بعض المشكلات أثناء عملية التقطيع بالميكروتوم ، نتيجة عدم إجراء التشريب بالشمع على الوجه الأكمل ، وللعالجة ذلك يلزم إعادة عملية التشريب بالشمع **Reinfiltration** شرط ألا يكون قد لحق أى ضرر بالأنسجة ، ويتم ذلك بإزالة الشمع بقدر الإمكان من حول العينات ، دون المساس بها ووضعها فى أحد مذيبات الشمع ، وتركها على درجة ٣٥° م لمدة ٢٤ ساعة ، ثم تنقل بعد ذلك إلى داخل لفرن ، وتحوى عملية تشريب الشمع من جديد كما سبق ذكره .

### ثانياً: الطمر فى السلوليدن Celloidin embedding routine

تستعمل هذه الطريقة لعمل قطاعات فى المواد الصلبة أو الهشة ، التى لا يصح شمع البارافين كدعامة لها . ومن الأمثلة على ذلك منطقة لنحام الأصل بالطعم والأنسجة المصابة التى تكون متهتكة ، وكذلك عند عمل القطاعات فى الأشجار الكبيرة . وللسلوليدن أحد أشكال لتروسليولوز ، والمذيب المستعمل له عدة عبوة عن الأثير وكحول الميثايل بنسب متساوية . والمعتاد تحضير ٥ تركيزات من محلول لسلوليدن وهى ٢ ، ٤ ، ٦ ، ٨ ، ١٠ / وتتلخص عملية التشريب بالسلوليدن فى نقل الأنسجة لثى سبق قتها وطرد الماء منها إلى محلول مخفف من السلوليدن ، وزيادة تركيز السلوليدن تتم بعدة طرق ، وفيما يلى شرح لإحدى هذه الطرق .

تحوى عملية طرد ماء من العينة باستعمال تركيزات متدرجة من كحول الإيثايل حتى لوصول إلى لكحول المطلق ثم إلى المذيب حيث تبقى مدة ساعة إلى عدة ساعات ثم تنتقل إلى محلول ٧٢ سلوليدن ، بحيث يكون حجم لمحلول ٥ أشل حجم لمودج على الأقل ، ثم تقفل لرجاحة بسدادة تثت سلك ، ثم توضع الزجاجة فى فرن على درجة ٣٥ - ٦٠° م . وعنى فترات تتراوح بين ٢٤ ساعة للدمادج التى سمكها ٣ - ٥ مم إلى يومين أو أكثر للدمادج الأسماك من ذلك ، غير لمحلول بمحلول آخر أكثر تركيزاً ، وذلك بإخراج الزجاجة من الفرن وتريدها ، واستبدال محلول ٧٢ بأخر ٨٤ ، ثم تعبد قفل الزجاجة ووضعها فى لفرن التالى ، ثم تكرر هذه العملية لمحلول ٦ و ٨ و ١٠ ، وبعد ذلك

بضيف قشوراً رقيقة من لسلوليد بلزجاجة كل ٢٤ ساعة . وعندما يصبح السلوليد سميكاً لدرجة أنه يسيل بصعوبة على درجة حرارة الغرفة يكون صالحاً لعمل قالب ، ويمكن التأكد من ذلك بوضع عود ثقاب جاف داخل محلول السلوليد ، فيأخذ معه كمية من لسلوليد .

يتم إعداد قالب السلوليد برفع جزء من النموذج ، وحوله كتلة من السلوليد السميك ، ثم يعمر في الكلوروفورم فيتصلب السلوليد في الحار ، ويكون شعاعاً ، ويحسن ترك الكتلة في الكلوروفورم لمدة ١٢ ساعة ؛ حتى يتم تصلب الأجزاء الداخلية . ثم ينقل النموذج بعد ذلك إلى محلول من أحجام متساوية من كحول الإيثايل ٩٥٪ والجلسرين ؛ ليحفظ فيه استعداداً لعملية القمع .

### ثالثاً: الطمر المزدوج في السلوليد وشمع البارافين

تتلخص هذه العملية في تشريب الأنسجة بالسلوليد ثم في شمع البارافين . وتستعمل هذه الطريقة في حالة النماذج المحتوية على أنسجة صلبة مع وجود مناطق هشة سهلة التكسر ، مثل سوق بعض الحشائش التي بها مناطق تحتوي على خلايا اسكلرنشيمية ملجئة بشدة ؛ مما يستدعى الأمر وجود دعامة أقوى من التي يمكن الحصول عليها من شمع البارافين . لذلك تجرى عملية الترقيد في السلوليد بإجراء عملية التصلب ، ثم يزان السلوليد المحيط بالنموذج ، مع تعريض الأسطح المقطوعة وعدم التعرض للأجزاء المحتوية على البشرة ، ثم تجرى عملية التشريب في شمع البارافين ، وبهذه الطريقة يمكن إجراء عملية القطع باستعمال الميكروتوم الدوار والحصول على شريط .

### رابعاً: الطمر في أشباه شموع تذوب في الماء

هناك طريقة وسط ما بين طرق طمر النماذج في الشمع أو السلوليد ، وقطع النماذج دون طمر . ويستعمل في ذلك مركبات صناعية تشبه الشمع ، ولكنها تذوب في الماء مثل مركب Glycerol monostearate الذي يذوب على درجة ٥٥° م .

تنقل النماذج الحية أو المقتولة من الماء مباشرة إلى المادة المستعملة المنصهرة (Glycerol monostearate) ثم توضع في الفرن لمدة ٤٨ ساعة تغير أثناءها ٦ مرات ، ولا يحدث أثناءها تشرب كامل للأنسجة ، ولكن تكتسب النماذج صلابة ؛ وبذا يمكن عمل قطاعات جيدة رقيقة بواسطة الميكروتوم المنزلق . وتنقل القطاعات إلى الكلوروفورم ، ومنه إلى الكحول ومن الأخير لصبغة .

## ٥ . الميكروتومات

### Microtomes

عرفت أجهزة تقطيع العينات لأول مرة خلال النصف الثاني من القرن الثامن عشر ، وكان يطلق عليها آلة التقطيع cutting machine ، وفى عام ١٨٣٩ أطلق شيفالييه (Chevalier) عليها لفظ ميكروتوم Microtome أى آلة القطع الدقيق . ولقد أدخلت على الميكروتومات عدداً من التعديلات كانت فى البداية تتناسب مع المجهر الضوئى حيث كانت تعطى قطاعات حتى سمك ٥ ميكرون تقريباً ، إلا أن هذه القطاعات وإن كانت تتناسب مع الفحص بالمجهر الضوئى إلا إنها تعتبر سميكة جداً للفحص بالمجهر الإلكتروني ، وفى الخمسينات من القرن العشرين تطورت الأشكال والطرز المختلفة للميكروتومات مما ساعد على ظهور أنواع منها تمكن من عمل قطاعات رقيقة جداً ( أقل من نصف ميكرون ) تتناسب مع الفحص بالمجهر الإلكتروني .

توجد طرز مختلفة من الميكروتومات مثل الميكروتوم الدور Rotary microtome والميكروتوم المنزلق Sliding microtome والميكروتوم الثلجى Freezing microtome والكريوستات Cryostate والميكروتوم الفائق Ultra microtome ، ويختلف استخدام كل منها تبعاً للنموذج وحالته والشخص ومهارته ونوعية الدراسة . ويستعمل لسرور الدور العينات المظورة فى شمع البارافين ، أما المنزلق فيستعمل للعينات الحية الصلبة المقتولة ، وغير المقتولة ، أو المظورة فى الشمع أو السللويدن ، أما النوع الثلجى فيستعمل فى حالة العينات الحية المقتولة ، وغير المقتولة وخاصة الرهيف منها ، والتي يصعب قطعها باليد أو يخشى من تلفها إذا تم تحضيرها بطريقة الشمع . ولقد تم تطوير الكريوستات لعمل قطاعات سريعة رقيقة مفككة لاستخدامها فى دراسة كيمياء الأنسجة ؛ حيث تقطع العينات بعد تجميدها دون تعريضها لدرجات حرارة عالية أو مذيبات الدهون . كما تم تصميم الميكروتوم الفائق لعمل قطاعات رقيقة جداً أقل من نصف ميكرون تدسب الفحص بالمجهر الإلكتروني .

## أولاً: الميكروتوم الدوار لقطاعات شمع البارافين

### Rotary microtome for paraffin sections

تعمل معظم الميكروتومات الدوارة بطريقة متشابهة حيث تتحرك العينة المثبتة جيداً في الماسك عبر حافة السكين الثابتة ، ويكون لتقدم محكماً بحركة الوند خلال مسطح مائل أو بواسطة حبل عمود الإدارة ، ويتم التحكم في السمك عادة مقدراً بالميكرون بداية من ١ ميكرون . ويجب حفظ الميكروتوم نظيفاً دائماً ، ويراعى تزيته بانتظام ويتسبب أى تآكل في الأجزاء في خلل في حركته ويتج عنه قطاعات تالفة . وسكين الميكروتوم Microtome knife ذات نصل حاد ، وللاحتفاظ بحافة حادة للنصل يراعى تكرار عملية السن على فترات مناسبة ، ويجدر بالإشارة أن النصل إذا تلف يصعب إصلاحه ، لذلك انجبت بعض المعامل إلى إنتاج أمواس ( شفرات حلقة ) ومواسك خاصة لاستعمال الطلبة لفترة قصيرة يتم بعدها التخلص منها .

بالإضافة إلى الميكروتوم والسكين يتطلب الأمر توفر الأدوات التالية :

- (١) فرشاة رسم صغيرة A small paint brush .
- (٢) عدد من الملاقط Forceps .
- (٣) العديد من المسطحات المستوية Several flat لاستقبال شرائط الشمع بعد التقطيع .
- (٤) علب كرتون من الورق المقوى Cardboard boxes لحفظ شرائط الشمع قبل تحميلها على الشرائح .
- (٥) زجاجة كلوروفورم صغيرة A small bottle of chloroform .
- (٦) فرشاة رسم  $\frac{1}{4}$  بوصة  $\frac{1}{2}$  - inch paint brush لإستخدامها في إزالة أشرطة الشمع الزائدة وغير المرغوب فيها .

## الإرشادات الأساسية للميكروتوم الدوار

### Basic directions for the rotary microtome

- (١) يجب أن يكون الميكروتوم نظيفاً عند البدء في العمل . ويراعى التخلص من كل شرائط الشمع الموجودة بالفرشاة . اختبر أداء عجلة اليد ، إذا كانت صعبة الحركة فيجب

تزييتها ثم نظف الأجزاء الداخلية للآلة ، واطمنن على ميكانيكية التشغيل . إذا كان ماسك الحركة عند نهايته فيجب إرجاعه بالكامل مع ضبط الميكانيكية .

(٢) ثبت عجلة اليد أو تركها في الوضع الذى يكون عنده الماسك فى أعلى وضع .

(٣) ثبت العينة بماسك القالب الشمعى ثم اصبط لسطح المربع لقالب الشمع ( الذى به العينة ) رأسياً وأفقياً بحيث تكون حافته العلوية والسفلية موازيتين لبعضهما البعض وتكونا موازيتين لقاعدة الميكروتوم ، ويجب أن يكون معلوماً أن الدقة فى ضبط القالب فى بداية العمل هامة جداً لنجاح عملية القطع .

(٤) امسح نصل سكين الميكروتوم بعناية بالكحول فورم لتنظيف حافته . ثم ثبته فى ماسك النصل ( أو الماسك وبداخله شفرة الخلاقة ) . اختبر بعناية زاوية النصل وثبات وضعه فى الماسك والمسافة بين قالب الشمع وماسك القالب ، وزاوية خط المركز للنصل ( شكل ٥ - ٨ ) والتي فى مواجهة القالب يجب أن تكون حوالى ٥٢° .

(٥) يجب أن تكون الحافة العلوية والسفلية لقالب الشمع متوازيتين مع بعضهما البعض ومع حافة السكينة . وإذا كان من الضروري إعادة ضبط قالب الشمع فيجب أن يتم ذلك بحرص ؛ حيث إن تهذيب القالب يتم بواسطة شفرة الخلاقة . فلا تسمح للشفرة أن تلامس حافة نصل السكين حتى لا تتعرض أصابعك للإصابة حيث يكون النصل حاداً جداً .

(٦) افتح عجلة اليد واخفض قالب لشمع حتى يصبح وجهه فى مستوى حافة نصل الميكروتوم . افتح النصل وحركه ببطء فى مواجهة القالب وأوقفه دون أن يلامس وجه القالب ثم أعد قفل نصل السكين جيداً فى مكانه .

(٧) اضبط مقياس سمك التقطيع حسب الرغبة ، يفضّل البدء عند سمك ١٠ ميكرون . عند استعمال ميكروتوم له عجلات مسننة Ratchet wheels تقوم بتحديد سمك القطاع ، لا تضبط السمك فى منتصف التدرج . اضبطه دائماً عند وقعة كاملة ( نكة ) لتجنب تلف الأسنان .

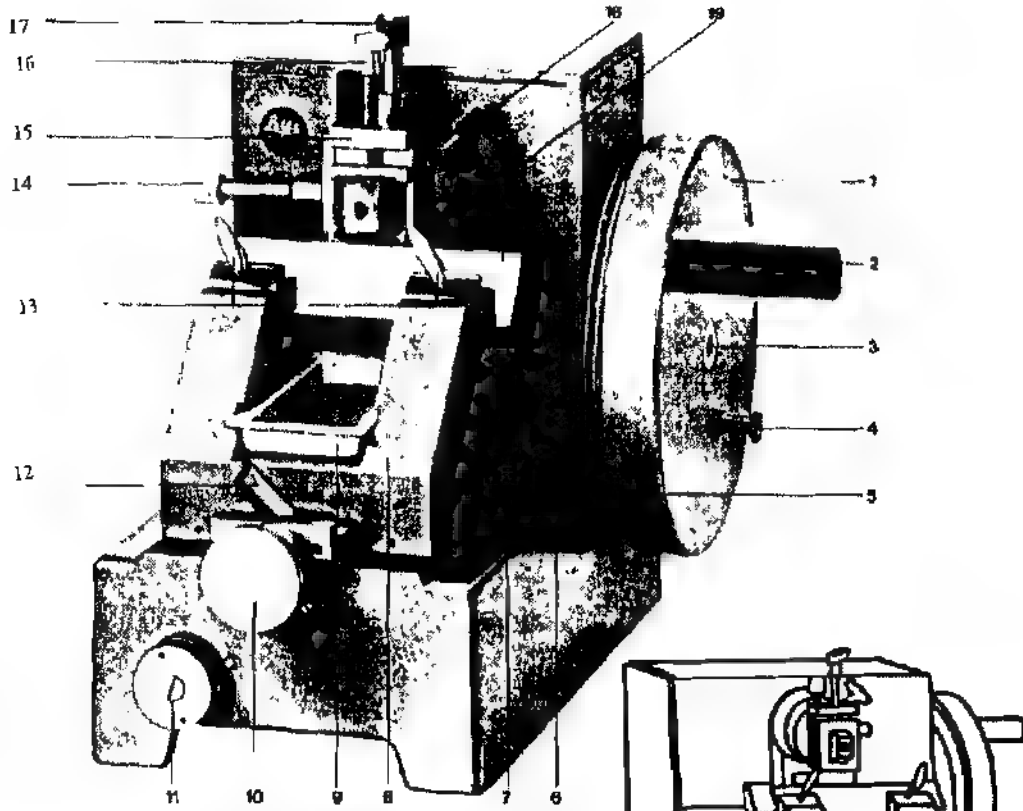
(٨) يراعى تحريك عجلة اليد بصورة منتظمة ، اسمح حوالى ١٠ سم من شريط الشمع بأن تتحرك أسفل النصل حتى يبدأ لشريط فى الانحناء لأعلى بالقرب من حافة النصل ،

عند هذه النقطة ضغ الملقط أو إبرة التشريح أسفل الشريط وهو لا يزال ملامسا لحافة النصل . امسك الشريط لأعلى مع عدم وضع أى ثقل عند مكان ملامسته للنصل ثم افصل الشريط بعد ذلك عند الحافة القاطعة أو أترك قدرًا ضئيلاً من الشريط لدى حافة النصل ؛ حتى يسهل تقطع الشريط وهذه العملية تحتاج إلى بعض التدريب . استمر فى تحريك عجلة اليد بإيقاع منتظم .

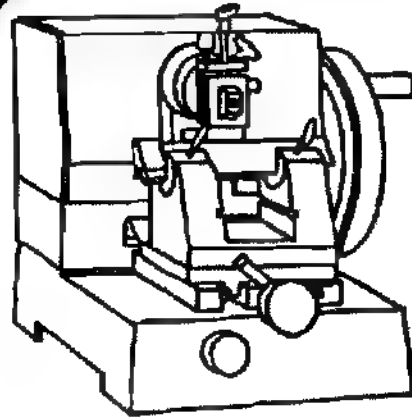
(٩) عندما يصل طول الشريط إلى حوالى ٢٠ سم افصله بفرشاة رسم من حافة النصل وذلك بحركة متجهة لأعلى . يجب ملاحظة أن استمرار احتكاك شعر فرشاة الرسم بحافة النصل يؤدي إلى تلف الحافة لذلك يجب أن تمر الفرشاة بسرعة بعيداً عن الحافة القاطعة للنصل . ضغ الشريط المتحصل عليه فى العلبة ( من الورق المقوى ) اخصه بحفظ الشرائط .

(١٠) عند الانتهاء من عمية القطع أو ترك الميكرونوم لأى سبب يتزع نصل السكين ريوضع فى لصندوق الخاص به . من المعروف أن معظم حوادث المعامل تكون نتيجة الإهمال فى التعامل مع نصل السكين .

ويصمم الميكرونوم لدور ( شكل ٥ - ١ و ٥ - ٢ ) بطريقة تسمح مع كل لفة لعجلته أن يندفع القالب الشمعى تجاه حافة السكين ممسدة عدة ميكرونات حسب ما تحدده بواسطة ضابط الميكرونات ( ضابط اسمك ) ، وبذلك فإن السكين مع لف عجلة الميكرونوم تقطع قطاعات شمعية بالمسك المطلوب وحدث من الوجه الأمامى للقالب الشمعى . ومن المفترض أن الحرارة الناشئة عن عمية التقطيع تعمل على التصاق القطاعات الشمعية المتتالية ؛ بحيث تكون الحافة العلوية للقطاع السابق ملصقة مع احافة السفية للقطاع اللاحق ، وبذلك يتكون شريط من القطاعات الشمعية يحتوى كل منها على قطاع من العينة المظموورة داخل القالب الشمعى - وتجمع شرائط الشمع من على السكين بواسطة فرشاه ، وتنفل إلى علبة الحفظ أبعادها ٢٠ × ٤٠ سم وذات ارتفاع ٤ سم ، ويراعى تزويد العلبة بالبيانات اللازمة عن العينة ويستحسن وضع فرخ من الورق الأسود فى قاع العلبة لبط شرائط الشمع عليه . ويراعى وضع شرائط الشمع بالترتيب ، بحيث يوضع أول القطاعات فى لركن الأيمن العلوى للعلبة ثم تتوالى اشرائط الشمعية نظام معلوم . مع ملاحظة أن يكون السطح غير اللامع لشريط الشمع إلى أعلى والسطح اللامع إلى أسفل . وإذا ما كان لصق القطاعات



- (9) حوص القطاعات .
- (10) التحكم في حركة ماسك السكين .
- (11) ضبط سمك القطاعات .
- (12) إحكام ماسك السكين .
- (13) ضبط رافعة مل السكين .
- (14) ضبط وضع ماسك العينة رأسياً .
- (15) إحكام ماسك العينة .
- (16) تحميل لعينة .
- (17) ضبط وضع ماسك العينة أفقياً .
- (18) تحريك ماسك العينة إلى الأمام .
- (19) السكين .

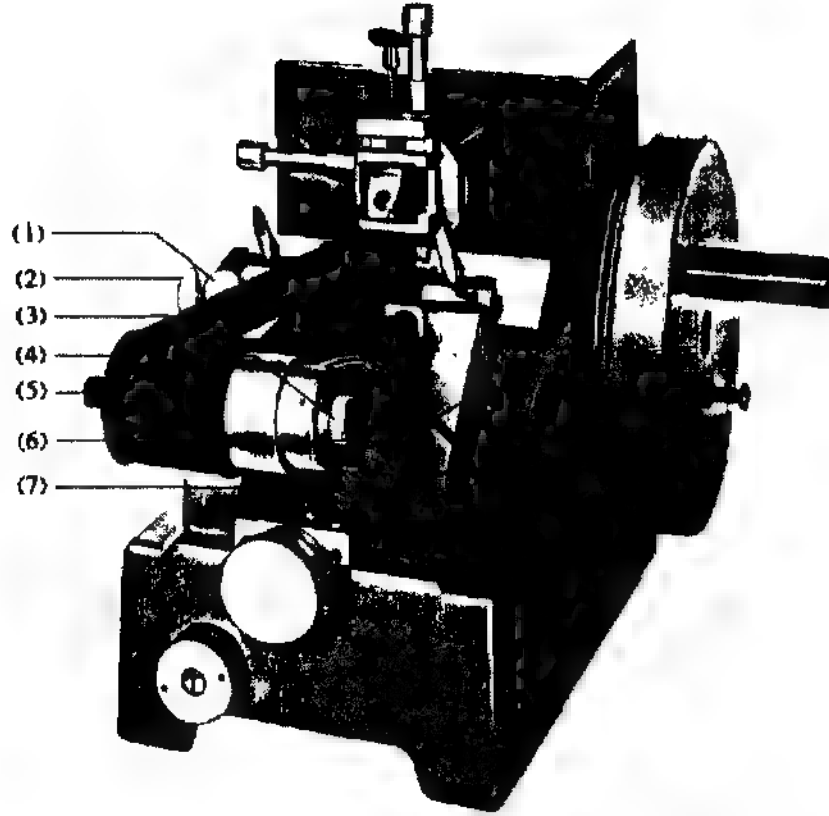


- (1) عجلة الإدارة .
- (2) ماسك .
- (3) مسدود تثبيت .
- (4) مسدود التحكم في حركة العجلة .
- (5) مجرى سير الحركة الآلية .
- (6) مسلك نقل الحركة الآلية .
- (7) رافعة الميل .

شكل (١-٥) . الميكرونوم للدوار .

(8) ماسك السكين .





- (1) مسمار لربط السير لناقل الأوتوماتيكي بـ كين الميكروتوم .
- (2) صمونه لتحميل السير لناقل الأوتوماتيكي على قالب اسكين .
- (3) السير الناقل الأوتوماتيكي .
- (4) قطعة مستديرة لتنظيم سرعة السير الناقل .
- (5) قطعة مستديرة لإدارة السير الناقل يدويا .
- (6) قطعة مستديرة لربط السير لناقل الأوتوماتيكي .
- (7) مثلث الانتهاء للسير الناقل الأوتوماتيكي .

شكل (٥-٢) ميكرونوم دور مروود سير ناقل لشريط الشمع

الشمعية على الشرائح الزجاجية سوف يجرى فى وقت لاحق تغطى علب شرائط الشمع لحمايتها من الأتربة ، مع حفظها فى مكان بارد حتى لا تلتصق القطاعات الشمعية بالورق الموضوع فى قاع العلبة .

### مشكلات عملية القطع بالميكروتوم الدوار والحلول المقترحة

#### Sectioning problems and possible remedies

حصر ريتشاردز (Richards) ١٩٥٩ ، المشاكل المصاحبة لعملية القطع والحصول الممكنة فيما يأتى :

- (١) إذا كان الشريط ملتويًا وغير مستقيم Crooked :
- (أ) الحافة العليا والسفلى للقلب غير متوازيتين لبعضهما البعض أو لحافة السكينة ، يراعى عمل التسوية اللازمة .
- (ب) ربما تكون حافة السكينة غير منتظمة ، جرب جزءًا آخر من حافة لسكينة أو استبدل السكين بأخرى حادة .
- (٢) إذا لم يتكون الشريط لانفصال القطاعات :
- (أ) حافة النصل تالفة - اشحذها .
- (ب) هناك خطأ فى ميل السكينة . اضبط زاوية الميل
- (ج) الحافة العليا والسفلى لوجه قلب الشمع مفتتة أو متكسرة Crumbled أو مستديرة Rounded ، فلزم إعادة تسويتها بشفرة حادة
- (٣) إذا كانت لقطاعات الناحية مضغطة أو ملتمة Compressed or Folded .
- (أ) حافة النصل تالفة - اشحذها .
- (ب) زاوية السكينة قريبة جدًا من الوضع الرأسى . استخدم زاوية أكبر .
- (ج) يعوق الشمع السكين - يراعى تنظيف الحافة بالكلوروفورم .
- (د) القطاعات رقيقة جدًا ، يلزم زيادة سمك التقطيع .
- (هـ) الشمع طرى جدًا لأن الحجرة دافئة . يبرد النصل بإسراع مكعبات من الثلج عليه ، أحيانًا قد يفيد تمرير مكعب من الثلج فى اتجاه معاكس لوجه قلب الشمع .

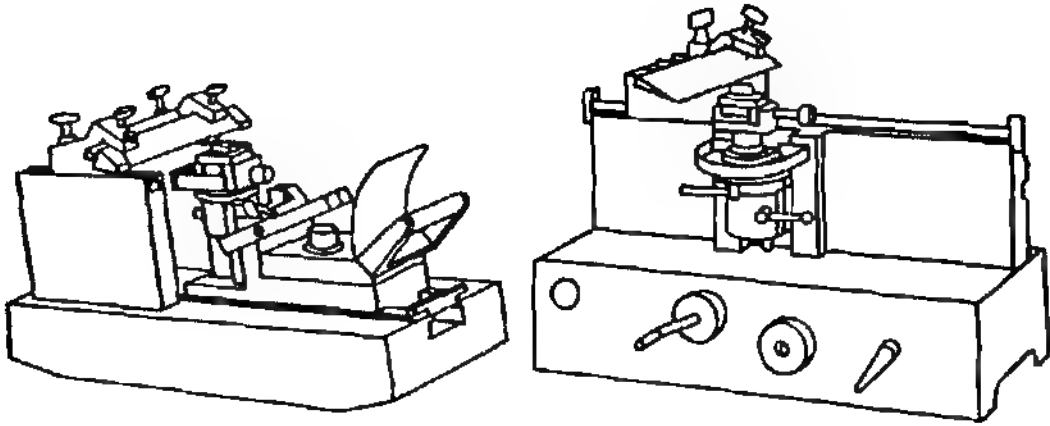
- ( و ) قد يوجد بالشمع آثار من الزيلول . يرم إعادة عملية الطمر .
- ( ٤ ) إذا كانت العينة مفتتة أو تسقط من شريط الشمع :
- ( أ ) قد يرجع ذلك إلى عدم التحميف والترويق الجيد للنسيج فيلزم انصهار الشمع وإعادة انتجيف والترويق .
- ( ب ) إذا كانت العينة صلبة جداً ومتماسكة فيجب عمل التطرية بالارسة بنقع قالب الشمع في الماء أو في كحول الإيثايل ٧٠٪ .
- ( ح ) مكثت لعينة في فرد لشمع لمدة طويلة ونحت درجة حرارة عالية ، في هذه الحالة يجب التخلص منها لعدم صلاحيتها .
- ( د ) لعينة صلبة جداً بالنسبة لطريقة الشمع كما هو الحال في العينات الخشبية مثلاً ، فيلزم تحرية طريقة الطمر في السلويدن .
- ( ٥ ) إذا كان الشريط يفصل باستمرار أو سحراً رأساً :
- ( أ ) يرجع ذلك لوجود درت من التراب عاتقة الحافة السكية أو على سطح قالب الشمع فيلزم تنظيف حافة السكية بعناية بالكلوروفورم
- ( ب ) أو قد يكون جزء المستخدم من نصن غير حاد . جرب جزء آخر من حافة السكية أو اسحده أو استبدلها بأخرى حادة .
- ( ٦ ) إذا كان شريط الشمع يلتصق حول مسعك أو حول صل السكين أو أى شئ آخر ، فإن المشكلة تكمن في تكهرب الأشرطة والتي غالباً د توحدها في الحجرات شديدة الجفاف ولعلاج ذلك ضع إناء به ماء يغلي باستمرار قريباً منك ، أو قم بعمل القطوعات في ساعات الصباح أو عمل أشربة قصيرة أو قم بتوصيل يد السكين بصنوبر ماء بواسطة سائ

## ثانياً: الميكروتوم المنزلق لقطاعات السلويدن

### Sliding microtome for celloidin sections

يسعمل الصمغ في السلويدن في حالة الساذج الكبيرة أو شديدة الصلابة ، وعلى ذلك فالميكروتوم المستخدم في قطاعات السلويدن عادة ما يكون كبير الحجم وله قاعدة ثقيلة .

ويعتبر الميكروتوم المنزلق ( شكل ٥ - ٣ ) هو الجهاز الذى يشيع استخدامه فى إعداد مقاطعات السللويدن حيث يكون القالب فى هذا النوع ثابتاً بينما يتحرك النصل الثقيل بزاوية خلال سطح القالب . ويجب على من يعمل على هذا النوع من الميكروتومات أن يأخذ حذره من النصل المتحرك فقد يتسبب فى حدوث أضرار خطيرة ، ولهذا السبب غالباً ما يزود معمل الميكروتنك بـ ميكروتوم دوار متين ذو نصل مثبت فى وضع أفقى وماسك القالب هو الذى يتحرك أفقياً تحت حافة النصل .



الانزلاق القعدة

الانزلاق السكين

شكل ( ٥ - ٣ ) . الميكروتوم المنزلق

تحفظ قوالب السللويدن فى ٧٠ كحول إيثايل ولا يجب أن تتعرض للجفاف ومن المعروف أن كحول لإيثايل المستخدم فى القطع وأثر الانزلاق للأسطح الموجهة للآلة القاصعة يمكن أن يتسبب فى تآكل هذه الأجزاء من الميكروتوم ويتسبب فى تلفه بسرعة . ولذلك يجب لحرص الشديد والعناية التامة فى تنظيف وتزيت كل الأسطح المرلقة . ويجب أثناء عملية القطع أن نطفو ماسك السكين على فيلم من الزيت . وبعد الانتهاء من عملية لقطع يجب مسح ونجفيف وإعادة تزييت كل الأسطح

ويحتاج العمل إلى توفير فرشاة رسم صغيرة لالتقاط المقاطع من على حافة سكين

وكأس به ٧٠٪ كحول إيثايل وعدد من الأطباق البترى تحتوى على ٧٠٪ كحول إيثايل توضع بها القطاعات .

ويجدر بالإشارة أن الميكروتوم المنزلق يستخدم أيضا فى عمل قطاعات بالعينات الصلبة التى تظهر فى شمع الدافين كما هو الحال فى الجذر أو الساق الذى حدث بهما نمواً ثانوياً ، حيث تستقبل القطاعات مرادى فى طبق بترى به ماء دافى تمهيداً للصقها بعد ذلك على شرائح ، ثم تتبع الخطوات المعتدة بعد ذلك .

### الإرشادات الأساسية للميكروتوم المنزلق

#### Basic directions for the sliding microtome

(١) ضع القاعدة المثبت عليها قلب السللويدن فى ماسك القالب . أترك بضعة ملليمترت من القاعدة معرضة فوق جنبى الماسك ، حتى لا يتسبب الضغط الواقع على الجانبين (فكى الماسك) فى انفصال قالب السللويدن

(٢) اضبط السطح لأفقى لقالب السللويدن . ثم احفض القالب بواسطة آلية التقدم لتقليل ارتفاعه وبذلك يصبح القالب غير معرض للخطر ثم تأكد من ضبط السكين . دائما صغ القالب أولاً قبل وضع السكين فى ماسك السكينة . ويحب أن يظل قالب السللويدن مبللاً بـ ٧٠٪ كحول إيثايل بواسطة فرشاة الرسم .

(٣) ادفع ماسك السكينة للخلف بحيث تصبح السكينة بعيدة عن القالب . بعد تثبيت سكينة جيداً فى الماسك ، اضبطها رأسياً على روية مقدورها ١٥° . أما الزاوية الأفقية للسكينة فتعتمد بدرجة كبيرة على العينة فمثلاً بالنسبة لقطاعات الأفرع بدأ بزاوية ٣٠° أو ٤٠° بين حافة السكينة واتجاه حركة ماسك السكينة ( يجب على كل شخص أن يكتشف بنفسه أفضل طريقة لضبط بالسبب له وهذه تأتي بالمران والخبرة ) . وبما أن وضع السكين يكون براوية أفقية بالنسبة لقلب السللويدن فإنها سوف تصطدم بركن لقلب قبل أن تقطع العينة إلى شرائح . والسكين هو الجزء المتحرك فى عملية التقطع بالميكروتوم المنزلق لذلك يجب أخذ الحذر الشديد لتجنب انزلاق أو تلف القالب أو حدوث ضرر لأصبعك .

(٤) احذب السكينة مباشرة فى مواجهة لقالب . واضبط سطح القالب بحيث يكون أفقى

- وموازي لحافة لتصل ، ولتقدم اليدوى أرفع سطح القالب حتى يتلامس فيلم كحول الإيثايل الموجود على سطح القالب مع حافة السكين .
- (٥) اصبط الشريخ على ٣٠ ميكرون حرك اسكسة للخلف ولأعلى بحركة ثنية . وبعد كل حركة للسكين يبلل سطح القالب وحافة السكينة بـ ٧٠٪ كحول إيثايل .
- (٦) بعد أن تعمل السكينة قطاعاً كاملاً سمك ٣ ميكرون ، اضبط آلية التقدم للسلك المطلوب .
- (٧) يجب أن يرفع كل قطاع من على حافة السكة بواسطة فرشاة رسم ، ثم تنقل مباشرة إلى طبق بترى يحتوى على ٧٠٪ كحول إيثايل . ويجب أن يبلل سطح القالب وحافة السكينة بالكحول قبل عمل لقطع التالى
- (٨) فى حالة الرغبة فى حفظ القطاعات مرتبة ، يوضع كل قصع فى طبق ستندر (Stender dish) على قرص من الورق يمكن ترقيمه .
- (٩) بعد الانتهاء من عملية القطع ، نزع السكين وجففها بحرص ، ثم صغ قالب السليدين فى وعاء يحتوى على ٧٠٪ كحول إيثايل ، ثم امسح الميكروتوم بعناية ، واعد تريت كل الأسطح .
- (١٠) تصبغ القطاعات على حدة قبل تحميلها على الشريحة والصيغة المستعملة فى قطاع السلوليد ، هى Delafield's Hematoxylin and Eosin Y .

### مشكلات عملية القطع بالميكروتوم المنزلق والحلول المقترحة

#### Sectioning problems and possible remedies (Richards, 1959)

- (١) إذا كانت القطاعات بها خدوش أو تفصل عن السليدين :
- (أ) السكينة تالفة حرك حافة السكينة أو شحدها
- (ب) توجد حريثات من التراب فى قالب السليدين - رشح محلون Parlodion قبل استعماله ثانية .
- (٢) إذا كانت القطاعات تسقط من قالب السليدين :

(أ) قد يرجع ذلك إلى عدم كفاية التحفيف والتشريب - أذب السلويدن وأعد الخطوات من جديد .

(ب) السلويدن طرى جدا - حاول تجميده في الكلوروفورم .

(٣) إذا كانت القطاعات غير منتظمة السمك :

( أ ) مارال أحد ضوابط الميكروتوم غير مثبت جيدا - أعد ربط كل المامير واختبر ثبت قالب السلويدن على قاعدته .

(ب) يتحرك ماسك السكين حركة غير منتظمة - حرك السكين بانتظام ، اترك السكين تقوم بعملية القطع .

(ج) زاوية ميل لسكين ضعيفة جدا - استخدم زاوية أكبر .

( د ) قلب لسلويدن جاف - نقعه في ٧٠ / كحول إيثايل ، وحرص على أن يظل مبللاً دائماً عند إجراء عملية القطع .

(هـ) السكين تالئة - جرب جزء آخر من حافة انصل أو اشحذها أو استبدلها بأخرى حادة .

### ثالثاً: ميكروتومات القطاعات المثجة ( المبردة )

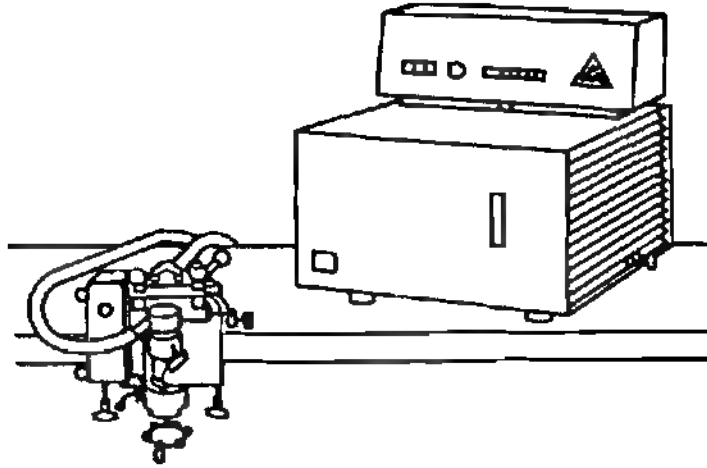
#### Microtomes for frozen sections

#### (أ) الميكروتوم الثلجي Freezing microtome

الميكروسوم الشجى الإكسينيكى Clinical Freezing Microtome ميكروتوم سيّد (شكل ٥ - ٤) ، يمكن تثبيته على مائده ومزود بجهر للتبريد بغاز ثانى أكسيد الكربون  $CO_2$  . وهو أساساً ميكروتوم منزلق وفيه يتحرك السصل بشكل حلقة أو قوس عبر النسيج المبرد الموجود على مائدة التبريد الثابتة ، ويتم تشغيله أوتوماتيكياً أو يدوياً ، وترفع مائدة لتبريد بعد كل دورة للسكين . من المعروف أن الميكروتومات المنزلقة الخاصة بالسلويدن يمكن تزويدها أيضاً بأجهزة تبريد وتعتبر ميكروتومات ثلجية ممتازة . وجهاز التبريد عادة عبارة عن غرفة معدنية مجوفة تتصل بأسطوانة بها غاز ثانى أكسيد لكربون حيث يتم التبريد بإطلاق الغاز على هيئة دفعات قصيرة داخل الغرفة ، ويبرد تمدد الغاز الغرفة بسرعة ويجمد

العينة الموضوعة على مائد التبريد . ويوجد الآن عديد من موائد التبريد الكهربى الحرارى ( التى تعتمد على تأثير Peltier ) ، يمكن التحكم فى كل من التبريد والتسخين بسهولة تامة . وتتلاءم هذه الموائد بسهولة شديدة مع أى من الميكروتومات المتزقة .

ويتطلب العمل وجود فرشاة رسم صغيرة ، وعدد من الملاقط ، وزجاجة تنقيط للماء المقطر .



شكل ( ٥ - ٤ ) : الميكروتوم الثلجى مزود بجهاز تبريد.

### الإرشادات الأساسية للميكروتوم الثلجى الإكلينيكي

#### Basic directions for clinical freezing microtome

- (١) افحص الميكروتوم لتتأكد من تزييته جيداً وأن كل الماسير محكمة وأن الأجزاء تتحرك بحرية وأن صمام أسطوانة غاز ثنائى أكسيد الكربون يُفتح ويُغلق بسهولة .
- (٢) ضع ورقة ترشيح مربعة صغيرة ( أكبر قليلاً من القالب ) على قمة مائدة التبريد وشبعها بقطرة ماء .
- (٣) ضع العينة المظمورة فى قالب الجيلاتين على ورقة الترشيح وأضف نقطة أخرى من الماء . ويجب أن يكون الماء دعامة عند قاعدة القالب ، ولكن يجب ألا يزيد حول



أجزاء القالب حتى يسهل القطع ؛ حيث أن الثلج الناتج عن زيادة كمية الماء سوف يصطدم بالسكينة ويتسبب في قطاعات غير منتظمة .

(٤) اضبط ارتفاع القالب حتى يصبح أسفل مستوى السكينة بمقدار  $\frac{1}{4}$  سم أطلق غاز  $CO_2$  على هيئة دفعات قصيرة حتى يتم تبريد العينة . امسك القالب الموجود على مائدة التبريد بواسطة ملقط لأسفل حتى تبدأ القاعدة في التجمد .

(٥) عند تجمد القالب اضبط السكين فوق القالب فينحرف الغاز فوق قمة القالب وتتم عملية التجمد بسرعة . ويؤدي هذا أيضا إلى تبريد السكين .

(٦) عند التشغيل ارفع القالب ، وعندئذ يمكن للسكينة أن تعمل قطاعات سمك ١٥ ميكرون . وتحدد الخبرة درجة الحرارة المثلى لقطع ، وسوف تفتت القطاعات إذا كان لقالب برذاً جداً أو تذوب داخل المادة اللزجة إذا كان القالب طرياً جداً . وتتطلب طريقة العمل التبريد المتوالى للقالب بدفعات الغاز وسرعة القطع لعدد من القطاعات عندما يكون القالب معرضاً لدرجة الحرارة المطلوبة .

(٧) ارفع القطاعات من على حافة السكينة بفرشة رسم صغيرة ، أو بواسطة طرف إصبعك الصغير ، ثم ضع القطاعات في طبق به ماء مقطر

(٨) يمكن لتدمل مع قطاعات الأنسجة المظموزة في الجيلاتين بسهولة بواسطة ساق زجاجية صغيرة ستوية على شكل عصا أجولف . وتصنع القطاعات بواسطة صبغة Sudan Black B وتحمّل في غروي الجلوسرين

### مشكلات القطع بالميكروتوم الثلجي والحلول المقترحة

Sectioning problems and possible remedies (Richards, 1959)

(١) إذا كانت القطاعات مفتتة :

(أ) القالب لم يتم تجميده كما يجب - إسرع وقت التجميد عن طريق إطلاق الغاز في دفعات أطول

(ب) لسكينة تالفة - شحذها أو استبدلها بأخرى حادة .

(ج) السكينة دفتة - بردها . علف السكينة شمع جاف بواسطة شريط شفاف ( مصنوع من السيليلوز ) .

(٢) إذا كانت القطاعات متباينة السمك :

(أ) السكينة تالمة - اشحذها .

(ب) بعض مسامير الميكروتوم أو الضوابط مفكوكة - اربط كل مسامير الضبط

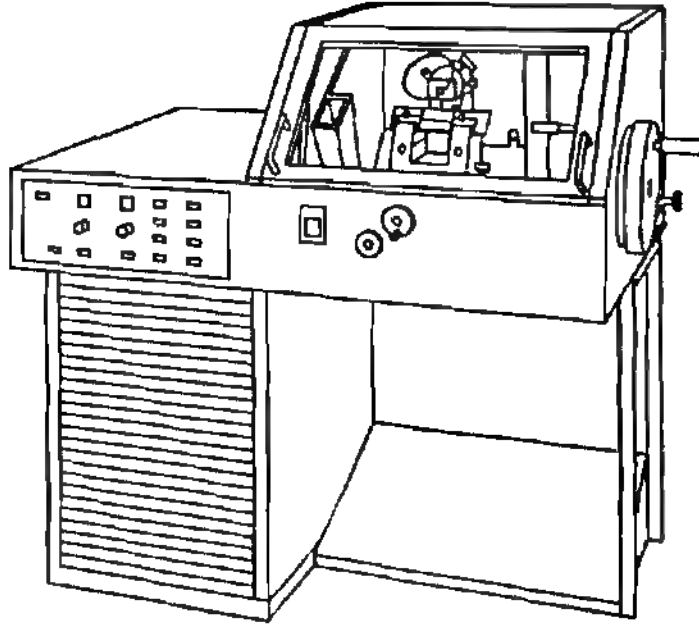
(ج) قد يكون الميكروتوم به عيوب فيجب إصلاحه ( صيانة الميكروتوم هامة جدا ) .

( د ) ينفصل لقالب عن مائدة التبريد - أذبه ثم أعد تجميده .

### (ب) ميكروتوم الكريوستات Cryostat microtome

يُصمم الكريوستات ( شكل ٥ ٥ ) لعمل قطاعات سريعة رقيقة ومفكوكة لاستخدامها في دراسات كيمياء الأنسجة ولفحص الأنسجة المستأصلة أثناء العمليات الجراحية . وهو أساساً ميكروتوم دوار موضوع داخل حجرة مبردة ، حيث يمكن من خلاله صمد درجات الحرارة المثلى لعدد كبير من الأنسجة . تعتمد القطاعات الجيدة على مدى حدة السكينة وسرعة تحمد الأنسجة على درجة الحرارة المثلى . يلاحظ أن عدداً من الأنسجة سوف يتمزق أثناء عملية القطع إلا إذا كانت مدعمة بقالب ، ويمكن طمر الأنسجة في الجيلاتين أو يتم إحاطتها بالصمغ العربي أثناء عملية التجميد . وللحصول على أفضل النتائج اضر النسيج بالكامل في مركب OCT (Lab Tec, Westmont, Illinois) أثناء لتجميد ، ويجب أن تكون عمسة التجميد سريعة حد لتجنب تكوين بللورات كسرة من الثلج . يجب أن تستكمل مراحل التجميد لسريع للكريوستات المتاح تجارب باستعمال رقائق من لثلج احاف أو دفعات قصيرة لغدر ثنى أكسيد ككربون أو عدر الكربون استنج من عبوة لضغط

ويحتاج العمل لوحود فرشاة رسم وزوجين من الملاقط ( أحدهم يوضع في غرفة التبريد ) ونظراً لأن خطوات الصبغ سريعة حدا فيجب أن تُعد محابيل لصبغ مقدما في أطباق كولومبيا Columbia dishes وذلك للأغصنة أو في أوانى الصبغ Coplin jars وذلك للشرائح .



شكل (٥ ٥) ميكروتوم الكريوستات

### الإرشادات الأساسية للميكروتوم الكريوستات

#### Basic directions for cryostat microtome

- (١) تثبيت درجة الحرارة في غرفة التبريد عند  $-20^{\circ}\text{C}$  . توصع موااسك العينة واللاقظ الإضافية وصندوق السكين والمصن يدخل غرفة التبريد لتبريدهم
- (٢) تثت الأنسجة لمفككة مباشرة على موااسك العينة . يرفع ماسك العينة ويسخن سطحه لمعاكس لاتجاه يدك ، وبحب أن نكون يديك جافة حتى لا تلتصق بالمعدات الباردة
- صع طليقة رقيقة من مركب OCT عند درجة احراره المناسبة على سطح النسيج
- ثم اطمر النسيج في مركب لزج ، أصف المزيد من المركب حتى يصبح السيج مغطى . يبرد الماسك بطريقة التجميد السريع فيتحمدا السيج بسرعة وانتظام ،
- أو باستخدام دفعات قصيرة ناتجة عن عبوة ضغط الفريون . ذلك بتعريضها فوق قمة النسيج .

(٣) ضع السكينة لمبردة فى ماسك السكينة ثم اضبط الزاوية على  $10^\circ$  . يمكن الحصول على القطاعات الأرفع من ١٠ ميكرون إذا كانت قطع الثلج الجاف مثبتة على السكينة لتبريدها

(٤) اضبط زاوية سطح ماسك العينة وهى أصغر من تلك المستخدمة فى ميكروتوم البارفين. تأكد من أن اسطح موازيا للسكينة فلا يرتطم الماسك المعدنى بحافة السكينة ويكسرها. إذا وجد جهاز مضاد للالتفاف Antiroll يجب ضبطه بحرص ، أما إذا لم يكن موجوداً فإن كل قطاع يجب توجيهه بفرشاة رسم لمنع تحمده .

(٥) ادفع عجلة الحركة بشدة أثناء الدوران لأسفل On the downstroke .

(٦) انقل كل قطاع برفعه بجهاز مضاد الالتفاف Antiroll ، ثم المس القطاع بالسطح المستوى لغطاء الشريحة ، يدوب الثلج ويلتصق القطاع فى الحال بغطاء الشريحة ويمكن وضعه فى مثبت . بعض الأنسجة مثل العضلات ولتى لا تلتصق بسهولة بغطاء الشريحة يجب تخفيفها لمدة ٣٠ ثانية عند درجة حرارة العرفة قبل تثبيتها .

(٧) يمكن استعمال طريقة صبغ Delafield's Hematoxylin and Eosin Y .

### مشكلات القطع بميكروتوم الكريوستات والحلول المقترحة

#### Sectioning problems and possible remedies

- (١) إذا كانت القطاعات تنهار أو سقط Collapse من على حافة النصل :
  - (أ) لتسيج أو السكينة أو اللانين معا لم يتم تبريدها كما يجب - انتظر حتى يتم تبريدهما فى غرفة التبريد المغلقة .
  - (ب) السكينة تالمة شحده .
- (٢) إذا كانت القطاعات مفتتة :
  - القطاعات باردة حد أعد ضبط درجة حرارة غرفة التبريد .
- (٣) إذا كانت القطاعات ممزقة أو مساية السمث :
  - (أ) لسكينة تالمة شحدها .
  - (ب) الميكروتوم مستهلك يجب عمل الصيانة اللازمة لإصلاحه .
  - (ج) لسكينة غير نظيفة نظفها .
  - (د) اسيج غير مرد جيدا أفحص الترموستات .

## رابعاً: الميكروتوم الفائق لقطاعات المجهر الإلكتروني

### Ultra microtome for electron microscope sections

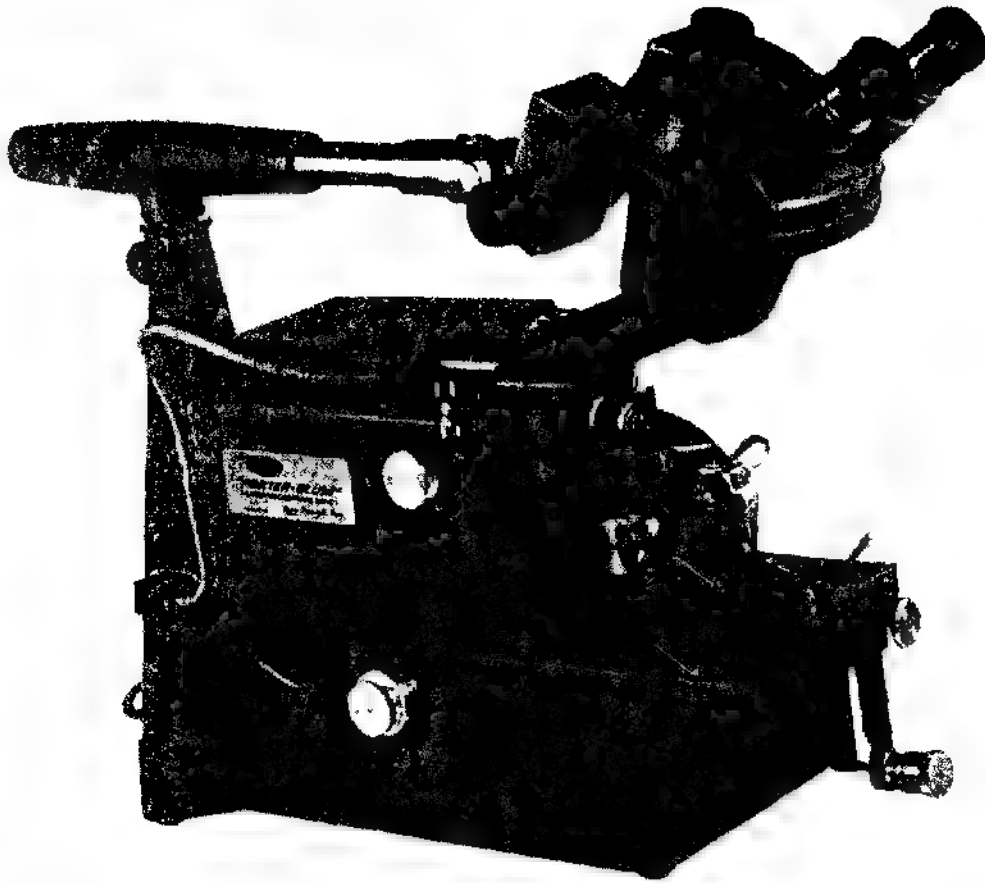
اعتمدت الدراسات الخاصة بالمجهر الإلكتروني في الأربعينات من القرن العشرين على الاستفادة من المناطق الرقيقة التي توجد على أطراف القطاعات المستدقة ذات الشكل الوندي باستخدام لميكروتوم القياسي ، لكن غالباً ما كان القطع سميكاً بدرجة لا تسمح باختراق الإلكترونات بالقدر الكافي ، كما أن الأطراف الرقيقة كانت صغيرة المساحة ولا تكفي للحصول على معلومات وافية .

كانت المحاولات الأولى لإنتاج قطاعات كاملة رقيقة تناسب المجهر الإلكتروني بتصميم الميكروتوم لژاند السرعة ، والذي قد تصر عدد القطاعات الناتجة عنه إلى أكثر من ٤٠٠٠ قطاع في الدقيقة الواحدة ، لكن المشكلات التي صاحبت لم تشجع على استمرار العمل به . ولقد كان الافتقار إلى بيئة تحميل مناسبة من أهم العوائق التي صاحبت تجهيز العينات فيما مضى ، فلم يكن شمع البارافين صلباً بدرجة تناسب التحضيرات المطلوبة للفحص بالمجهر الإلكتروني .

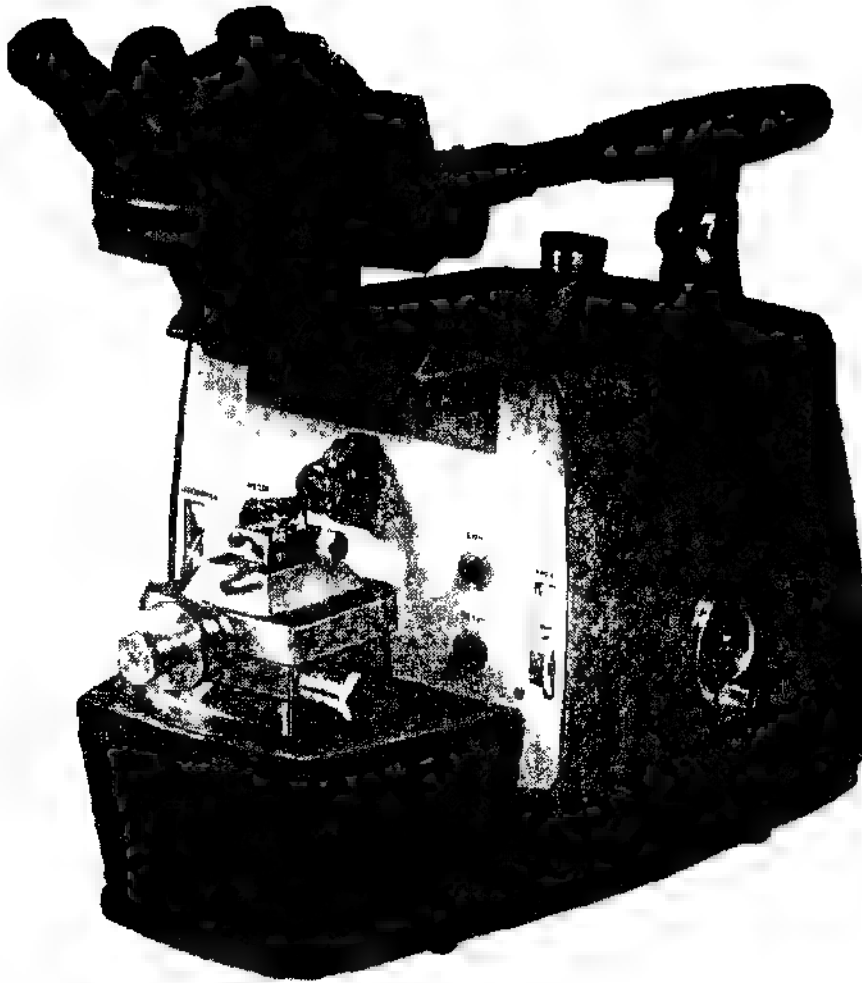
حاول البعض في بداية الأمر تصميم ميكروتوم توضع العينة به على حامل على هيئة قرص يتحرك دويرياً للتغلب على مشكلة احتكاك العينة بالسكين في رحمة العودة ، ولقد قدمت المصانع عدداً من أشكال الميكروتومات ، منها على سبيل المثال طراز يعطى في ذات الشريط قطاعات ذات سمك مناسب لفحص بالمجهر الإلكتروني ، وأخرى تناسب الفحص بالمجهر الضوئي ، وذلك يبيح الفرصة لإجراء مقارنة للقطاعات المتحاوره باستخدام كل من المجهر الإلكتروني والضوئي .

وبعد استخدمت السكين ابرجاجية عام ١٩٥٠ بدلاً عن السكين المعدنية ذات حافة النص الحادة ، وحل محلها بعد ذلك السكين الماسيه

يوضح كل من الشكل (٥ - ٦) و الشكل (٥ - ٧) الميكروتومات الفائقة طرازي MT 1 و MT - 2 وهي تعتبر أجهزة قطع متقدمة تمكن الشحوص دا لحبرة القليلة نسبياً من عمل قطاعات لكن من المجهر الضوئي والإلكتروني ومن مميزات هذه الميكروتومات أن لمجرى خائبي للسكين يكون أثناء حركة القطع مجهزاً لعمل قطاعات سمكية ورقيمة بالتبادل دون إيقاف لخطوات القطع أو عاده ضغط التدرج .



شكل ( ٥ - ٦ ) : الميكروتوم الفائق طراز MT-1 مرود بمجهر مزدوج  
العدست ومصدر ضاءة

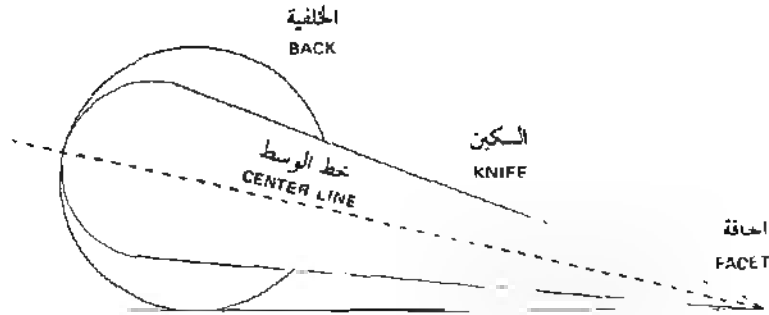


شكل (٥ - ٧) : الميكروتوم المائق طراز MT-2 مزود بمجهر مردوج  
العدسات ومصدر إضاءة.

## سكين الميكروتوم Microtome knife

تصنع سكين الميكروتوم من صلب على درجة عالية من الجودة لين Soft بالدرجة اننى تسمح بسنّه إلى حافة حادة جدا ، وصلد Hard بالدرجة التى تحافظ على حدة الحافة خلال احتكاكها بشمع البارافين وما به من أنسجة مظلورة . لا تصنع سكين الميكروتوم من الصلب غير القابل للصدأ لذلك يجب العناية بها حتى نتحاشى حدوث أى صدأ . فإذا ما صدأت حافة السكين تكونت بها نقر وتصبح عديمة الفائدة . وبطبيعة الحال فإن السكين المستعملة مع الميكروتوم الثلجى تكون أكثر عرضة للتلف نتيجة للصدأ .

عادة ما تزود سكين الميكروتوم بخلفية Back على هيئة أنبوبة من الصلب تتزلق على الجهة الخلفية من السكين حيث تتحكم فى زاوية ميل السكين المطلوبة عند وضعها على ححر السر .



شكل ( ٥ - ٨ ) شكل تخطيطى لقطع عرضى بسكين الميكروتوم ( ويلى willey ١٩٧١ ) .

تحدد زاوية ميل السكين أثناء السن الزاوية بين سطحى الحدة Facet وبالتالي نوعية القطع - تزود كل سكين تسن يدويا بخلفية خاصة بها - ولا تتطلب السكين التى تسن آليا أى خلفية حيث تكون زاوية ميل السكين ثابتة بجهز السن - ولا يجوز فى المرات المتتالية سن ذات السكين بالأسلوبين لاختلاف زاوية الميل فى كل منهما ، لذلك يشبه سن كل سكين إما يدويا أو آليا . لا تختبر حدة السكين بقطع شعرة أو خيط ، وإلا نعاد عملية السن مرة أخرى .



يمكن للمبتدئ الاستعاضة عن السكين بشفرة حلقة مثبتة بماسك خاص وتدل الشفرة  
بغيرها عندما تصير الحافة غير حادة Dull أو متقرة Nicked وتفصل الشفرات السمكية نوعاً  
ما للحصول على نتائج أفضل .

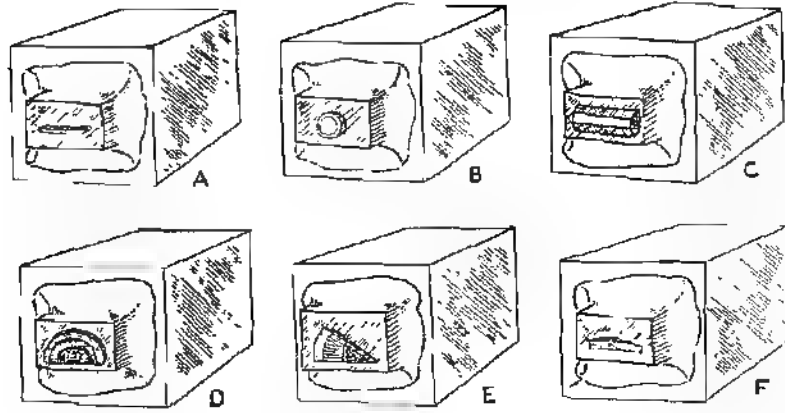
تمحص حافة السكين بالمجهر الضوئي - ضع السكين على حامل خشبي بحيث تكون  
مائلة بزاوية قدرها ٥٢° على أن تكون الحافة إلى أعلى ضع السكين على مائدة  
المجهر وفحص الحافة بالعدسة الشبكية قوة ١ واحترس أن تلامس لعدسة حافة السكين  
استخدم ضوءاً ساقطاً ، ترى حافة السكين الحادة على هيئة خط دقيق ومستقيم من ضوء  
منعكس . تعكس السكين غير الحادة ضوءاً أكثر وتكون الحافة منشارية الشكل يتخللها  
النفق .

يراعى عند إتمام عملية القطع بالميكروتوم نزع السكين ( أو الشفرة ) وتجفيفها جيداً -  
والسن إن لزم تظلي السكين بطبقة شحم أو فازلين لحمايتها من الرطوبة أثناء لحفظ  
حتى لا تصدأ كما يراعى أيضاً نظافة الميكروتوم ووضع غطاء عليه حتى لا يتعرض  
للأتربة .

## ٦ . قطع العينات Sectioning

### قطع العينات النباتية المغمورة في شمع البارافين تجهيز القوالب للقطع بالميكروتوم:

(١) يؤخذ من قالب لشمع المحتوى على العينات النباتية قطعة صغيرة مستظمة قائمة الزوايا تحتوي على إحدى العينات، مع مراعاة وضع العينة بالنسبة لاتجاه حركة السكين حتى يتحقق الهدف المطلوب - ويوضح شكل (٦ - ١) نماذج لأوضاع العينة أثناء عملية القطع . ويجب أن يكون السطح المعد للقطع مربعاً أو مستطيلاً متورى لأضلاع قائم الزوايا حتى تحصل على شريط منتظم ومستقيم ، ويجب أن يتم التقطيع بواسطة مشرط ، سلاحه مستقيم ، والأفضل استعمال شفرات الخلاقة ، وتتم عملية التقطيع لقالب الشمع بطريقة السحب، وليس عن طريق الضغط حتى لا يتكسر قالب الشمع



شكل (٦ - ١) : أوضاع العينات مختلفة الأشكال أثناء القطع بالميكروتوم.

- A - تحميل ورقة لعمل مقاطع عرضية
  - B - تحميل ساق صغيرة لعمل مقاطع عرضية .
  - C - تحميل ساق صغيرة لعمل مقاطع طولية .
  - D ، E - تحميل جزء من ساق لعمل مقاطع عرضية .
  - F - تحميل جزء من ساق عشبي كبير لعمل مقاطع قطرية ( شعاعية ) .
- ( ساس Sass ١٩٦١ )

(٢) يترك إطار مناسب من الشمع حول النموذج (حوالى ٣ مم) ، عند تنظيم الشمع ويستحسن ترك مسافة أكبر جهة القاعدة ، حتى يكون هناك مجال لتحميل القطعة على حامل الميكروتوم وبذلك يمكن قطع العينة حتى نهايتها بسهولة وانتظام .

(٣) تلصق القطعة المحتوية على العينة بعد تجهيزها بسوية سطوحها على حامل الميكروتوم المعدنى أو الخشبى أو المصنوع من لبلستيك ويتم ذلك بإدابة بعض قشور من الشمع مشروط ساخن على سطح الحامل ، ثم تغرس القطعة فى وسط هذا الشمع المنصهر ثم تترك لتبرد فيتحمّد لشمع وتلتصق القطعة بالحامل يضاف مزيد من الشمع المنصهر حول الجزء لقاعدى من القطعة لعمل دعامة لها وتأكيد تثبيتها على حامل الميكروتوم .

(٤) تنظم القطعة المحتوية على لعينة بحيث تكون فى الوضع المناسب على حامل ميكروتوم ، تبعاً للغرض من القطع إذا كان طولي أو عرضياً .

(٥) يغمر الحامل فى ماء بارد حتى يتصلب الشمع ، ثم يوضع الحامل فى موضعه من الميكروتوم الذى يكون قد تم إعداده للعمل ، ويكون السطح المعد للقطع موازياً لحافة لسكين عند وضع الحامل فى مكانه من الميكروتوم ، وبذا يمكن البدء فى عملية القطع بتحريك يد الميكروتوم أو إدارتها حسب نوع الميكروتوم المستعمل ، وذلك بعد تنظيم سمك المقاطعات بواسطة الدليل الخاص الموجود بالميكروتوم ، ويكون القطع بسمك ٥ ٢٠ ميكرون حسب النموذج (الميكرون (u) = ١ / ١٠٠٠ مم) .

(٦) تقطع العينة الباتية بهذه الطريقة فى قطاعات متسلسلة متصلة ببعضها فى شريط طويل ، يمكن فصل الشريط عن سكين القطع بفرشة صغيرة ، كلما وصل الشريط إلى لطول المناسب (نحو ٢٠ سم) تحفظ الأشرطة منبسطة فى علب من الكرتون المبطن بورق أسود مصقوف ، مع مراعاة تسلسل لقطاعات .

(٧) هذه الأشرطة رقيقة جداً فيجب الاحتراس عند التعامل معها ، حتى لا تتمزق أو تلتوى على بعضها البعض فتتلف ، كما يجب عدم تعرضها للهواء أو النفخ حتى لا تتطاير تهيداً لوضعها بعد ذلك على الشرائح .

### العوامل التى تؤثر على عملية القطع Factors influencing sectioning

يتوقف نجاح عملية القطع بالميكروتوم على عدة عوامل متفاعلة مع بعضها البعض ، ومن أهم هذه العوامل مايلى .

### (١) نوعية الشمع المستخدم Quality of the paraffin wax

يرعى أن تكون صلابة الشمع متناسبة مع طبيعة أنسجة لعينة النباتية ، وسمك لقطاعات المطلوبة ودرجة حرارة الغرفة ، ويجب أن يكون الشمع ذا قوام حيبي دقيق جداً وخالٍ من الفقاعات والشوائب والبقع المعتمة

### (٢) التشريب النموذجي بالشمع Proper infiltration

يؤدي عدم التشريب النموذجي بالشمع إلى انفصال العينة عن الشمع وإذا ما فحصت العينة بالعدسة ترى الأنسجة مفتتة ؛ نتيجة عدم كفاية التخلل أثناء عملية التشريب بالشمع ، أو نتيجة زيادة تصبب الأنسجة مما يجعلها هشّة بطبيعتها ، وقد يلاحظ انفصال القطاعات بعد القطع بعيداً عن الشمع المحيط بها ، نتيجة عدم اتصال السطوح الخارجية للعينة بصورة جيدة من الشمع المحيط بها ، وقد يتحتم عدم تشريب الكافي بالشمع عن عدم تمام لتجفيف أو السرعة في إجراء عملية التشريب بالشمع .

### (٣) توجيه العينة النباتية المحملة Orientation of the mounted material

يراعى أن تكون العينة النباتية في منتصف الشمع عند القطع ، وإلا فتكون الطبقة السميكة من الشمع إلى أعلى لمقاومة الضغط النجم عن عملية القطع ، ويراعى ألا تكون طبقة الشمع المحيطة بالعينة كبيرة ؛ حتى تكون القطاعات متساوية ، وبالتالي يمكن الانتفاع بأكبر مساحة من الشريحة عند التحميل وفي ذلك توفير لعدد الشرائح والأغطية والشمع ، وكذلك الاقتصاد في استعمال الكيماويات المذابة للشمع . ويراعى أن يكون سطح العينة موازياً لحافة السكينة ، ويكون وضع السكينة على زاوية قائمة مع اتجاه حركة حامل النموذج ( إلا إذا كان المطلوب عمل قطاعات باتجاه خاص ) ، كما يراعى زاوية الميل بين سطح السكينة المسطح وسطح العينة ، وتعرف بالتجربة .

### (٤) ثبات التحميل Rigidity of mounting

يراعى أن يكون الحامل المشبث عليه العينة النباتية مثبتاً في مكانه بالميكروتوم ، لا يتحرك ، وأن تكون العينة ملتصقة ومثبتة تماماً بالحامل ، أن يحكم القفل على السكينة حتى لا تتحرك أو تهتز أثناء التقطيع ، إذ إن أي حركة بأي من هذه المواضع ينشأ عنها قطاعات غير متماثلة السمك ، وهذا يمكن اكتشافه في الشريط ، ولكنه يكون أكثر وضوحاً بعد الصبغ حيث تكون القطاعات السميكة أغمق لونا من الرقيقة .

## (٥) الظروف الحرارية Temperature factors

تتأثر عممية التقطيع بدرجة حرارة الغرفة والعينة النباتية والسكين ، فإذا كانت درجة حرارة إحدى هذه الأشياء مرتفعة عن اللازم . فإن القطاعات تنضغط وتتجمع فتعجن على حافة السكين مكونة كتلة غير متميزة . وعلى العكس من ذلك إذا كانت درجة الحرارة لإحدى هذه الأشياء أقل من اللازم فإن القطاعات تلتوى أو لا تلتحم مع بعضها ، وبذلك لا يتكون لشريط المطلوب . ومن الملاحظ أن القطاعات السمكة تتحمل درجات الحرارة العالية عن القطاعات الرقيقة .

## (٦) صلابة العينات النباتية Hardness or brittleness of the materials

إذا اتبعت كل الاحتياطات السابقة ، ولم يمكن الحصول على قطاعات وشرائط جيدة فقد يرجع ذلك إلى صلابة العينات ، ويمكن التغلب على ذلك بتطريتها وذلك بتسوية جهة العينة الموازية للسكين بحيث تتعرض الأنسجة ثم يوضع الحامل بما عليه من عينة نباتية فى ماء فاتر ، وتؤدي هذه المعاملة إلى تطرية العينة بما يسمح بعمل قطاعات جيدة . وقد يوضع الحامل والعينة فى كأس به ماء ثم يوضع فى فور على درجة حرارة ٣٥ - ٤٠ م لمدة ١٢ ساعة أو أكثر تبعاً لحجم وطبيعة العينة . إذا لم تنجح هذه المعاملة فى الحصول على النتائج المرجوة فقد يرجع ذلك إلى أن العينات صلبة جداً وبذلك لا تصح للقطع بطريقة الشمع أو أن عمليتي التجفيف والتشرب لم تتم كما يجب .

## (٧) تكهرب الأشرطة

من لصعوبات اننى قد تنشأ أثناء عملية القطع تكهرب الأشرطة ؛ مما يسبب اندفاعها بقوة تجاه الأدوات الأخرى فتلتصق بها أو تلتوى على بعضها مما يسبب تلفها ، ويمكن تجنب ذلك بغلى ماء فى المعمل حتى ترتفع الرطوبة إلى درجة كافية لمنع هذا التكهرب أو تقليله إلى أدنى حد ، ويمكن كذلك توصيل يد السكين بحنفية الماء بواسطة سلك .

## (٨) قد يكون شريط الشمع غير مستقيم ويرجع ذلك لسبب أو أكثر ممايلي :

(أ) لمطقة المستعملة من السكين ثلمة ولد يجب تحريك السكين أو إيدالها بأخرى حادة .

(ب) السطح العلوى والسفلى للعينة غير متوازيين ولذا يجب عمل التسوية اللازمة .

(ج) الحافة السفلية للعينة غير موازية للسكين ويلزم تنظيمها .

(د) العينة لنباتية ليست فى منتصف لشمع تماما ويلزم عمل التسوية اللازمه .

(هـ) العينة نفسها غير منتظمة الشكل والحجم

## قطع العينات النباتية غير المطمورة فى شمع البارافين

### اولا : القطاعات اليدوية Hand sections

يمكن عمل هذه القطاعات فى عينات نباتية حية أو محفوظة وذلك باستعمال موسى تشريح أو شفرة حلاقة . ويمكن بالتمرين الحصول على قطاعات رقيقة . قد تبدو هذه الطريقة دون الطرق الأخرى ولكنها تعطى تحصيلات ممتازة خاصة لدراسة الطبقة ( وفى هذه الحالة يجب أن يقوم الطالب بنفسه بجمع العينات وعمل القطاعات فذلك أدعى إلى التعرف على تركيب هذه العينات حتى ولو لم تكن هذه القطاعات على جانب كبير من الجودة فذلك أفضل من فحص الشرائح المجهرة بطرق أخرى ) . كما تفيد هذه الطريقة فى توفير كثير من الجهد الذى يبذله الباحث الذى يرغب فى عمل دراسة خاصة فما عليه إلا عمل دراسة شاملة للعينات ليتعرف على الصعوبات ويحدد الأجزاء الجديرة بالدراسة .

ولاشك أن الصبر والمراد والمهارة الفطرية أهم ما يجب أن يتصف به الباحث حتى يتمكن من القيام بهذه العملية على الوجه الأكمل . فالتصائح أو التوجيهات قد لا تكون ذات قيمة فى مثل هذه الأحوال .

وتجرى هذه العملية باستعمال نخاع البيلسان أو دونه ، حيث تشق قطعة من نخاع البيلسان طوليا ثم تحفر مجرى تناسب سمك لعينة ، يربط لنخاع والعينة بداخله ثم يوضع فى ماء يتمدد النخاع وبذلك يغلف العينة تماما ويسهل قطعها بالموس ، ويمكن الاستعاضة عن نخاع البيلسان بجذر الجزر ويراعى أن يكون كل من الموس والعينة مبللين دائما بالماء ، تعوم القطاعات فى طبق بترى به ماء أو فى تركيز من الكحول يعادل التركيز الذى وصلت إليه العينة عند القطع . فمثلا عند قطع عينة فى محلول F. A. A. أو غيره من محاليل القتل والتثبيت يرعى غسلها والبدء فى إجراء عملية التجفيف حتى تصل إلى ١٧٠ أو ١٥٠ كحول ثم تعمل القطاعات وتعوم فى لتركيزات المناسبة .

إذا عملت قطاعات يدوية فى عينات حية يرعى بعد القطع قتل وتثبيت القطاعات ويستعمل لذلك محلول قتل مناسب للعينة تحت الدراسة . ويتم القتل فى الحال غالباً إذا ما كانت القطاعات رقيقة ثم تعمل القطاعات بعد نحو ١٠ دقائق من القتل .

ويجب مراعاة فحص القطاعات قبل صبغها بعدسة جيب للتأكد من سلامتها . وتتبع الطريقة المناسبة للصبغ سواء المفردة أو المزدوجة . إذا كانت الصبغة المفردة أو الصبغة الأولى في حالة الصبغ المزدوج مائية يلزم أن نصل بالقطاعات إلى الماء إذا كانت قد قتلت في الكحول أو في محلول F. A. A. وتتبع الخطوات التالية : يضاف إلى القطاعات المختارة في زحاجة الساعة كحول إيثانيل 75 ثم يضاف ثلث الكمية ماء ، بعد 3 - 5 دقائق يسكب نصف كمية السائل ويضاف كمية مساوية للمتبقى ماء ، تكرر عملية السكب والإضافة 2 - 3 مرات . وفي النهاية يسكب كل السائل ويضاف ماء ثم يسكب الماء وتضاف الصبغة المائية المراد استخدامها . أما إذا كنت الصبغة المراد استخدامها مذابة في الكحول فيمكن إتباع الخطوات السابقة ، وبدلاً من إضافة الماء تضاف تركيزات متدرجة من الكحول حتى يصل إلى تركيز لصمة .

## ثانياً: القطع بواسطة الميكروتوم

### (1) القطع بواسطة الميكروتوم الثلجي Freezing microtome

تستخدم هذه الطريقة بصورة خاصة في حالة العييات اللينة الرقيقة التي يصعب قطعها باليد أو يخشى من تلفها إذا تم تحضيرها بطريقة الشمع ، وهي طريقة سريعة يمكن بها عمل قطاعات كبيرة كاملة . والأساس في استعمال الميكروتوم الثلجي تبريد العينة بواسطة غاز ثاني أكسيد الكربون  $CO_2$  أو الأثير لدرجة التجمد في محلول مناسب لا يتبلور بالتبريد ، وبالتالي نكسب العينة صلابة يمكن بها قطعها بسهولة . والميكروتوم الثلجي معد لعمل قطاعات سمك محدد ( بالميكرون ) ميكانيكياً ومروود بجهاز للتبريد يتصل من خلال ثبوت معدنية بأسطوانة لغاز السائل  $CO_2$  ، عند فتح صمام الغاز يندفع الغاز بقوة عسى درجة حرارة منخفضة جداً فيتجمد المحلول الذي يحيط بالعينة المحملة على مائدة التبريد وذلك تكون كتلة صلبة متماسكة يمكن قطعها بسهولة .

ويستعمل المحلول التالي عادة في تحميم العييات :

ماء مقطر ٢٠ مل

صمغ عربي ٢٠ جم

فينول أو ثيمول ( مادة حافظة ) ١ جم

قد يستعاض عن الصمغ بالجيلاتين أو لأحار بعمل محلول نصف مائل على درجة حرارة لغرفة ويضاف إليه مادة حافظة ١, ٠٪ فينول .

يمكن باستعمال الميكروتوم الثلجى قطع العينات النباتية لحية أو المقتولة ، تجزأ العينات إلى قطع ذات حجم مناسب وتوضع فى ماء بارد ، ثم تنقل بعد فترة مناسبة إلى محلول الصمغ العربى وتترك به فترة وجيزة يعد خلالها الميكروتوم للاستعمال ، أما إذا كانت العينات مقتولة فيتم ندرجها حتى تصل إلى الماء ثم فى محلول الصمغ العربى حتى يعد الميكروتوم كما سبق فى حالة العينات النباتية الحية .

ليس الهدف من وضع العينات النباتية فى الصمغ أن تتشربه الأنسجة تماما وإنما تغلف لعينات به من جميع الجهات بطبقة منتظمة من محلول الصمغ . توضع نقطة أو اثنتين من الصمغ العربى ، يتجمد محلول ويصير أبيض اللود ، تحمل العينة وتنظم فى الوضغ المناسب مع استمرار تدفق الغاز وإضافة محلول الصمغ ، عندما تصل العينة المحملة إلى درجة صلابة مناسبة تجرى عملية القطع ، وترد السكين لدرجة قريبة من درجة حرارة العينة . تستقبل القطاعات فى طبق بترى أو رجاجة ساعة بقلها من فوق السكين بواسطة فرشاة ناعمة ، يذوب الصمغ وتكون القطاعات معدة للخطوات التالية من التحضير ، يراعى أن تكون القطاعات سميكة نسباً ( ٣٠ - ٤٠ ميكرون ) .

#### (ب) القطع بواسطة الميكروتوم المنزلق Sliding microtome

تستعمل هذه الطريقة إذا لم يكن ممكناً الحصول على قطاعات كاملة بطريق القطع اليدوى وذلك فى الأنسجة البالغة أو الكبيرة الحجم .

تجهز لعينة بطول ٣ سم وتثبت فى مسك الميكروتوم بحيث يبرز منها ١ سم أعلى الحافة العلوية للماسك ، وتثبت السكين فى وضغ مائل على محور الانزلاق حتى تكون مائلة بالنسبة للعينة مع مراعاة وجود مسافة بين حامل السكين وماسك العينة . يراعى أن تكون العينة والسكين متلتين دائماً للماء ، ترفع القطاعات من فوق حافة السكين بفرشاة مبللة بالماء أيضاً حيث تنقل إلى طبق تترى به ماء تختبر القطاعات بعدمه حيب ويستبعد غير الصالح منها . يتبع بعد ذلك الخطوات السابق ذكرها فى لقطاعات اليدوية فيما يتعلق بالتجفيف ولصغ .



مع هو جدير بالذكر أن الميكروتوم المتزلق يعمل أيضا في حالة العينات المظمورة في الشمع في حالة صعوبة قطعها بالميكروتوم الدائري نتيجة للصلاية الرتدة للعينة أو عندما تكون هشة سهلة التكسر حيث تثبت العينة بصفتها معد تنظيم اشمع حولها على حامل الميكروتوم وهو على شكل متوازي المستطيلات من الخشب أو لبلاستيك بحجم يناسب الماسك تستقبل القطاعات في طبق بترى به ماء ويتخب الصالح منها ثم يلصق على شريحة كما هو متبع في قطاعات اشمع وتستكمل خطوات الصنع والحفظ المستديم .

### قطع العينات النباتية المظمورة في السللويدن

إذا كان المطلوب عمل قطاع عرضي نحرر النموذج لمطوب من السللويدن العليظ القوام وكذلك حامل مناسب به ثقب ، ثم يوضع الفرع في الثقب بشرط أن يبرر منه ٦ - ١٠ ملليمترات ، مع وضع قطع من عود لثقاب بين جدار الثقب والنموذج لزيادة التثبيت ثم توضع كتلة من السللويدن لسميك حول الفرع على الحامل ثم توضع هذه المجموعة في الكلورفورم لتتم عملية التصلب . أما إذا كان المطلوب عمل قطاع طولي فيوضع الفرع على كتلة غير مثقوبة ، وتحاط بالسللويدن لسميك وتجري عملية التصلب في الكلورفورم ، إذا كانت النموذج محفوظة في محلول حفظ ( أحجام متساوية من كحول الإيثايل ٩٥٪ وجليسرين ) تنقل إلى كحول مطبو مع تغييره مرتين على فترات من ٤ - ٨ ساعات ، هذه العملية تزين الكمية الصغيرة من الماء لتي قد توجد نتيجة الحفظ في حالة التخزين كما أنها تقلل من درجة تصلب السللويدن ، ثم توضع النموذج في محلول سللويدن سميكة مع الحامل بعد مرور ٢٤ ساعة تجرى عملية التثبيت كما سبق .

تتم عملية القطع بواسطة الميكروتوم المتزلق وفيه لا يتحرك النموذج وإنما السكين هي التي تتحرك والسمك المعتاد القطع عليه هو ١٥ - ٢٠ ميكرونا ، ويجب أن تكون السكين والنموذج مبلين كحول ٩٥٪ أثناء القطع وتسنقل القطاعات في كحول ٩٥٪ - ويجب ضبط زاوية ميل السكين وانحرافها حتى نحصل على قطاعات غير ملتوية وغير متكررة - ويمكن حفظ القطاعات اسليمة في محلول جليسرين والكحول حين صبغها .

## ٧ . لصق القطاعات على الشرائح

### Affixing paraffin sections to the slide

يراعى فى البداية تجهيز شرائح نظيفة تمامًا ومحفوظة فى كحول ٩٥٪ وتجفف بقطعة من القماش الذى لا يترك أوباراً ( قطعة من التريكولين أو الحرير ) ويستعمل فى عملية اللصق أحد المحاليل الآتية :

#### (١) محلول ماير Mayer's adhesive

ويحضر بالطريقة الآتية :

زلال بيض Egg white ٥٠ مل

جلرين Glycerine ٥٠ مل

فينول Phenol crystals ١ جم

يمكن استعمال سائيسالات الصودوم أو ثايمول بدلاً من الفينول .

يستعمل بيض طازج - يفصل الرلال ويضاف الجلجرين والفينول ويرج جيداً حتى يتكون عدد كبير من فقاعات الهواء . يترك المحلول مدة لترتفع فقاعات الهواء إلى السطح وترتفع معها المواد الغريبة ويصبح المحلول نقياً صافياً - يزل الريم الذى يتكون على السطح ويرشح المحلول فى قماش موسلين . يجدد المحلول كل ستة أشهر . ويستعمل معه الماء لتعويم الأشرطة

هناك تركيبة أخرى يدخل فيها الألبومين كأساس ، ويستعمل منها خليط جهاز يسمى ألبوزول Albusol ، ومركب المحلول اللاصق كالاتى .

ألبوزول ٥ مل

ماء مقصر ١٨٥ مل

فورمالين ١٠ مل

ويجدد هذا المحلول شهرياً .

## (٢) محلول هاوبت Haupt's adhesive

ويحضر كالآتي .

جيلاتين	١ جم
ماء مقطر	١٠٠ مل
جلسرين	١٥ مل
فينول بلورات	٢ جم

يذاب الجيلاتين في الماء على درجة حرارة ٣٥° م وعند تمام الذوبان يضاف الفينول ثم الجلسرين ويقلب جيداً ثم يرشح . يستعمل محلول فورمالين ٢ - ٤ ٪ لتعقيم أشرطة الشمع .

يوجد تركيب آخر يدخل فيه الجيلاتين كأساس ، ويحضر كالآتي :

جيلاتين	١ جم
ماء مقطر	٩٠ مل
فورمالين	١٠ مل

يقوم هذا المحلول بتعقيم الأشرطة ولصقها في نفس الوقت ويحضر شهرياً .

### خطوات العمل

- (١) يقطع شريط الشمع إلى أشرطة قصيرة مناسبة الطول تناسب مع طول الأغشية ، التي تستعمل في التحميل ، ويفضل أن لا يزيد طولها عن ٤ سم .
- (٢) توضع نقطة من محلول ماير أو هاوبت على الشريحة ويدهن بها السطح بتمرير إصبع نظيف عدة مرات وإزالة الزائد من المحلول ، حتى لا يتبقى على سطح الشريحة إلا طبقة رقيقة جداً متجانسة منتظمة الانتشار .

- (٣) تنقل القطاعات أو الأشرطة المجهزة إلى الشريحة ، وتضاف عدة قطرات من الماء المقطر أو فورمالين ٢ - ٤ ٪ حسب المحلول المستعمل في اللصق وتحرك الشريحة قليلاً حتى ينتشر الماء أو الفورمالين على السطح فتطمو عليه الأشرطة .

(٤) تسخن الشريحة على لوحة ساخنة حتى تنبسط الأشرطة ، ويزول كل أثر لانكماشها وتجمدها ويجب ألا تسخن إلا بالقدر اللازم لإزالة الإنكماش والتجعد ، ولا يجب أن تصل الحرارة إلى درجة انصهار الشمع فإن ذلك يتلف الأنسجة .

(٥) يزال معظم الماء أو الفورمالين الزائد بإمالة الشريحة ولس حافتها التي انجبه إليها السائل بقطعة من الشاف أو ورق الترشيح . ثم تنظم القطاعات أو الأشرطة بإسرتين في الوضع المناسب ، ويزال ما تبقى بواسطة ورقة نشاف أو ترشيح بحيث تصبح الشريحة جافة تماما وإلا فإن الماء أو الفورمالين مع اللاصق المستعمل يأخذ لصبغة ويشوه الشريحة

(٦) توضع الشريحة بعد ذلك في مكان دافئ غير معرض للعبار كالطابق العلوى من فرد الشمع لمدة لا تقل عن أربع ساعات للأنسجة الرهيفة ، ولا تقل عن ١٢ ساعة للأنسجة البالغة أو الصعبة اللصق .

(٧) يجب أن يكون التصاق شريط الشمع بسطح الشريحة تاماً ، لا تتخلله فقاعات من لهواء وإلا فإن القطاعات تكون عرضة للسقوط أثناء معاملتها، فسي محاليل الصبغ المختلفة . ولا ضرر هناك من حفظ الشرائح بعد لصق القطاعات وتخفيفها أى مدة من الزمن حتى تصبغ .

أ



ب



شكل (٧ ١) : نظام لصق القطاعات على الشريحة.

أ - غطاء شريحة مربع . ب - غطاء شريحة مستطيل .

## إزالة الشمع Deparaffinize

يلزم بعد لصق القطاعات على الشرائح الزجاجية أن يزال الشمع حتى يمكن القيام بالعمليات التالية من صبغ وتجهيف وترويق وتحميل .

وتجرى العملية كالآتي :

(١) تغمس الشرائح فى وعاء به زيلول نقى لمدة ١٠ - ٢٠ دقيقة .

(٢) تكرر عملية الغمس فى وعاء آخر به زيلول نقى لمدة ٥ دقائق

(٣) تنقل الشرائح بعد ذلك إلى وعاء به ٥٪ زيلول لمدة ٥ - ١٠ دقائق .

(٤) يتم نقل الشرائح بعدها إلى وعاء به كحول مطلق لمدة ٥ دقائق .

(٥) تكرر عملية النقل إلى وعاء آخر به كحول مطلق لمدة ٥ دقائق .

يوصل التدرج حتى لتركيز المناسب للصبغة ، فإذا كانت الصبغة مذابة فى كحول ٥٠٪ مثلا يتم التدرج بالشرائح إلى كحول ٧٠٪ ثم تنقل بعد ذلك إلى الصبغة المذابة فى كحول ٥٠٪ . أما إذا كانت الصبغة مذابة فى الماء فتدرج بالشرائح إلى الماء ثم إنقلها إلى الصبغة . أى بعبارة أخرى تدرج بالشرائح إلى تركيز معادل لتركيز المذيب للصبغة أو للخطوة السابقة مباشرة لتركيز مذيب للصبغة .

يمكن أذ بحر الأسيتون أو كحول الأيزوبروبائل محل كحول الإيثايل بعد إذابة الشمع .

## لصق القطاعات التى تعمل باليد أو بالميكروتوم الثلجى أو المخزلق

يمكن لصق القطاعات على الشرائح قبل صبغها حتى يسهل إجراء عملية الصبغ وحفظها من التلف الذى قد يصيبها أثناء الخطوات المختلفة حتى التحميل . ويستعمل فى ذلك محلول جيلاتين فولز ويتكون من :

جيلاتين + حامض خليك ثلجى + ٧٠٪ كحول + شب الكروم

### طريقة تحضيره :

يذاب ٤ جم من الجيلاتين فى ٢٠ مل من حامض الخليك الثلجى على حمام مائى ،

مع التقليب . يؤخذ من هذا المحلول ٥ مل ويضاف إليها ٧٠ مل من كحول ٧٠ ثم يضاف ١ - ٢ مل من محلول شب الكروم لدى قوته ٥ ٪ ، ادهن لشرائح بالخليط ، ثم تترك لتجف وبذا تحتفظ بقابليتها للانتفاخ واللصق في وجود الماء . انقل لقطاعات إلى الشريحة وذلك بتغطيس لشريحة في طبق البترى تحت القطاع ، ثم ترفع الشريحة برفق وعليها القطاع في المنتصف ، يضغط عليها بورقة ترشيح مبللة برفق حتى يتم اللصق ، ثم تترك في الغرفة العلوية من الفرن لتجف .

## ٨ . الصبغ

### Staining

لا تتمكن العين البشرية من تمييز المحتويات المختلفة بالخلية بسهولة لعدم وجود قدر كافٍ من التمييز بينها ، لذلك كان لزاماً صبغ القطاعات بصبغات مختلفة حتى يمكن فحص الخلايا والأنسجة مجهرياً في سهولة ويسر .

لا توجد صبغة معينة تصلح لجميع الأغراض وتعطى المعلومات اللازمة عن مختلف الخلايا والأنسجة ، ويستعمل عادة للفحص العام نوعين من الصبغات تعطى كل منهما لوناً متميزاً عن الأخرى Stain and counterstain يمكن بواسطتهما التمييز بين النواة والسيتوبلازم ، وقد يستعمل البعض صبغة مفردة أو توافق معينة من الصبغات للحصول على معلومات محددة تتعلق بخصائص كيميائية أو تركيبية خاصة .

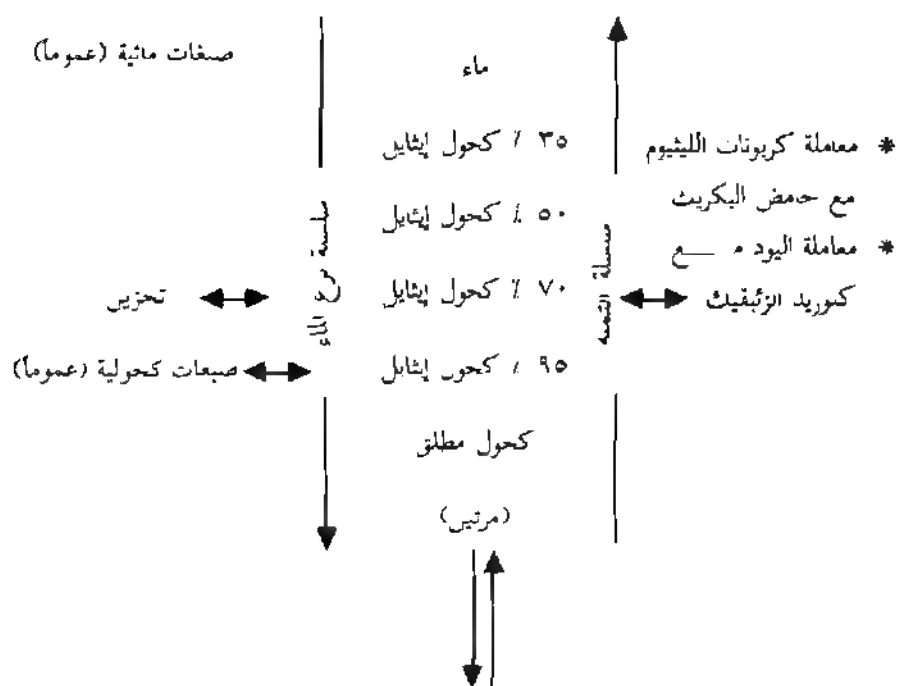
ويلزم قبل استخدام أى صبغة الوقوف بقدر الإمكان على الخصائص المميزة لها ، وما زال فعل الكثير من الصبغات غير معلوم ، وإن وجد البعض الآخر الذى تحدثت خصائصه فالكثير من لصبغات لها Auxochrome ، وهو الجزء الفعال من الجزيء الذى يتحد مع مكونات الأنسجة ، كما يوجد للصبغة Chromophore وهو الجزء المسئول عن اللون المميز للصبغة

قد يتحد Auxochrome مباشرة مكوناً ملحقاً مع محتوى معين من الخلية أو نسيجة الامتصاص أو بكليهما ، بعض الصبغات مثل الهيماتوكسلين Hematoxylin وهى ضعيفة جداً بمفردها يلزم لها وسيط يساعدها على الاتحاد مع الخلايا ، وهو ما يسمى بالمظهر Mordant الذى يكون رابطة مع مكونات الخلايا ، بينما صبغات أخرى مثل Sudan Black B تذوب مباشرة في محتويات الخلية .

تجرى عملية الصبغ في أوانٍ زجاجية نظيفة لعل أفضلها Coplin jars ، وفى حالة القطاعات غير المحملة مثل القطاعات الميكروترم الثلجى أو لسليودن فيتم صبغها في أطباق صغيرة Stender dishes أو زجاجات مدعة .

يراعى كتابة البيانات اللازمة على الأواني وبحكام العطاء عليها على الدوام ، وتنظف لأوانى من أى صبغات تلوثها من الخارج ، وإذا ما لزم إحراء فحص مجهرى سريع أثناء

يحدد الشكل التخطيطي جدول (A 1) الخطوات المتتابعة التي تعامل بها لقطاعات أثناء الصنع



شرائح عليها ← ريدول نقى ← زيلول وكحول مطلق ← زيدول نقى ← تحميم وتغطية الشرائح  
 قطاعات بارافين (مرتین) (مرتین)

جدول (٨-١) . مخطط يوضح عمليتي التمييه Hydration ، ونزع الماء Dehydration ، خلال الخطوات المتتابعة التى تعامل بها القطاعات فى عملية الصنف.



تنقسم الصبغات تبعاً للأصل الذي نشأت منه إلى صبغات طبيعية وأخرى صناعية ، وفيما يلي شرح لكل من هاتين المجموعتين :

### أولاً: الصبغات الطبيعية Natural dyes

توجد ثلاث صبغات طبيعية تستعمل مع الأنسجة النباتية ، وهذه الصبغات لم يمكن حتى الآن تحضيرها صناعياً ، وهي ذات أهمية خاصة في الدراسات السيتولوجية ، هذه الصبغات هي :

#### (١) صبغة الهيماتوكسيلين Hematoxylin

تستخرج هذه الصبغة من نبات *Hematoxylin campechianum* L. وتستعمل في الدراسات الهستولوجية ، وهي من أهم الصبغات على الإطلاق ، تحضر هذه الصبغة بطريقتين أساسيتين تبعاً للغرض من استخدامها ، وهما كالتالي :

##### الطريقة الأولى:

يحتوى المحلول في هذه الطريقة على الصبغة والمظهر (المثبت) Mordant والعامل المؤكسد ومادة حافظة ، ويستعمل هذا المحلول غالباً في الأغراض التشريحية ، ويسمى المحلول باسم من حضره لأول مرة ، وتوجد منه ثلاثة أنواع تسمى كالتالي :

(1) Mayer's Hematoxylin

(2) Harris's Hematoxylin

(3) Delafield's Hematoxylin

وتعرف الصبغة في هذه الحالة بأنها ذاتية المظهر Self mordant ويشار إليها عادة بالمصطلح Hemalum .

#### طريقة تحضير صبغة Delafield's Hematoxylin

يذاب ٤ جم هيماتوكسيلين في ٢٥ مل كحول إيثانيل ٩٥ ٪ ثم يضاف إلى المحلول :

٣٦ جم Ammonium alum  $(\text{NH}_4 \text{ Al } (\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$

٤ مل ماء مقطر

يترك المحلول بعد ذلك لمدة أسبوع معرضاً للضوء ، مع وضع غطاء غير محكم ، ويرشح المحلول ثم يضاف ما يلي :

١٠٠ مل جلسرين

١٠ مل كحول الميثايل ١٠ ٪

يترك المحلول لمدة ٦ أسبوع لينضج ، يحتفظ المحلول الأساسى للصبغة بصلاحيته لما لانهاية .

### الطريقة الثانية :

لا يخلط المظهر فى هذه الطريقة مع الصبغة فى محلول واحد ، بل يعامل النموذج أولاً بالمظهر (مثل شب الحديد Iron alum) ثم يتبع بالصبغة ، ومن أمثلتها :

Heidenhain's iron alum Hematoxylin

وتحضر كما يلى :

(أ) يجهز محلول أساسى Stock solution من الهيماتوكسلين بالتركيز التالى :

١٠ جم صبغة هيماتوكسلين

١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪

يترك المحلول الأساسى للصبغة لفترة لا تقل عن ٣ شهور قبل استعماله حتى ينضج ، ثم يخفف بنسبة :

١ محلول أساسى : ٩ ماء مقطر . ويرشح .

(ب) يتركب المظهر من شب الحديد

Iron alum (Ferric ammonium sulphate,  $\text{Fe NH}_4 (\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )

وتستخدم البللورات البنفسجية فقط حيث تحلل البلورات البنية ، ويجهز المحلول بالتركيز التالى :

- المظهر Mordant ٤ جم شب الحديد فى ١٠٠ مل ماء مقطر .

للتمييز Differentiator ٢ جم شب الحديد فى ١٠٠ مل ماء مقطر .

ويرشح المحلول قبل الاستعمال

## (٢) صبغة البرازيلين Brazilin

يمكن الحصول على هذه الصبغة من مجموعة أشجار مختلفة ، تعرف بغابات البرازيل Brazilwood وإن كنت تستخرج أساساً من نبات *Caesalpinia crista* أو *C. echinata* وتعمل حالياً بكثرة لصيغ تحضيرات الدهك Smears .

تستعمل صبغة البرازيلين عادة بتركيز ٠.٥ ٪ في كحول إيثايل ٧- ٪ ، وتخزن لنحو أسبوع قبل الاستعمال لتتضح ، والبرازيلين ليست صبغة بذاتها ، وإنما يستح تأثيرها عقب تفاعلها مع المظهر شب الحديد Ferric ammonium sulphate .

## (٣) صبغة الكوشينيل Cochineal

تستعمل أيضاً مشتقاتها Derivatives لكارمين Carmine وحمض الكارمينيك Carminic acid ويمكن الحصول عليها بعد طحن الأجسام المجففة لإناث حشرة الكوشينيل حيث يتسبج مسحوق لونه أحمر مصفر ، ويمكن الحصول على الكارمين ذى اللون الأحمر اللامع بعد إضافة محلول لشب إلى الكوشينيل . وللكارمين أهمية فى الدراسات لسيولوجية كما فى حالة الأسيتوكارمين Aceto-carmine

## ثانياً: الصبغات الصناعية Coal-tar dyes

تستخرج كل صبغات هذه المجموعة من قار الفحم Coal-tar وهى كثيرة العدد جداً وسيكون مجال اهتمام هذه المجموعة فيما يستخدم منها فى الأغراض النباتية . وتحضر صبغات هذه المجموعة باستخدام أحد المذيبات المذكورة بجدول (٨-٢) ، وعادة ما تحضر للصبغات بالتركيزات التالية .

(١) ٠.٥ - ١ ٪ فى الماء المقطر .

(٢) ٠.٥ - ١ ٪ فى كحول الإيثايل ٥ ٪ أو ٧٠ ٪ أو ٩٥ ٪ .

(٣) محلول مشبع فى زيت القرنفل أو فى حجم متساوية من زيت القرنفل والكحول المطلق (أى نسبة ١ : ١) ، وقد يستبدل الكحول بالميثايل سيلوزولف Methyl cellosolve أو فى حجم متساوية من زيت القرنفل والكحول المطلق والميثايل سيلوزولف .

جدول (٨-٢) : المذيبات الأساسية (X) التي تستخدم في تحضير  
الصبغات الصناعية المستعملة في الأغراض النباتية

المذيب			الصبغة
زيت قرنفل	كحول إيثانول /	ماء مطهر	
	٧٠ /	X	١ - الفوكسين الحمضي Acid Fuchsin (acid)
	٥٠ /	X	٢ - أزرق الأنيلين Anilin Blue (acid)
	٥٠ /	X	٣ - أزرق القطن Cotton Blue (acid)
	٧٠ /		٤ - بي البسمارك Bismarck Brown Y (basic)
X		X	٥ - لفسجى المتبلور Crystal Violet (basic)
	٩٥ /		٦ - لايسين Eosin Y (acid)
X	٩٥ /		٧ - لإرثروسين Erythrosin (acid)
X	٩٥ /		٨ - الأخضر السريع Fast Green (acid)
X	١٠٠ /		٩ - لرتقالى الذهبى Golden Orange (acid)
X	٩٥ ٥٠ /	X	١٠ - السفرانين Safranin O (basic)

#### الاستعمالات النباتية الأساسية للصبغات الشائعة

The principal botanical uses for the common stains

(١) الجدر السيليلورية Cellulose cell walls

- الهيماتوكسلين ذاتية لمظهر Hematoxylin (self-mordanting type)  
(زرقاء اللون)

- الأخضر السريع Fast green FCF.

أزرق الأنيلين Anilin blue

بي البسمارك Bismarck brown Y.

- الفوكسين الحامضي Acid fuchsin

Congo red أحمر الكونغو

Light green - الأخضر الضوئي

**Lignified cell walls** (٢) الجدر الملمجة للخلايا

- Safranin (حمراء اللون) السفرانين

- Crystal violet البنفسجي المتبلور

**Cutinized cell walls** (٣) الجدر المكونة للخلايا

- Safranin السفرانين

- Crystal violet البنفسجي المتبلور

- Erythrosin (قرنفلية اللون) الإريثروسين

**Middle lamella** (٤) الصفيحة الوسطى

- Iron Hematoxylin (غير داتية لمظهر) الهيماتوكسولين

- Ruthenium red (material cut fresh) أحمر الروثينيوم

**Chromosomes** (٥) الكروموسومات

- Iron Hematoxylin الهيماتوكسولين

- Safranin السفرانين

- Carmine (for acetocarmine smears) (حمراء اللون) الكارمين

**Mitochondria** (٦) الميتوكوندريا

- Iron Hematoxylin الهيماتوكسولين

**Cytoplasm** (٧) السيتوبلازم

- Eosin Y. أيوسين

- Erythrosin B. الإريثروسين

- الأخضر السريع Fast green FCF

- البرتقالي الذهبي Orange G

(A) هيفات الفطر فى أنسجة المائل Filamentous fungi in host tissues

الهيماتوكسيلين Iron Hematoxylin

- السفرانين Safranin

- الأخضر السريع Fast green FCF

(4) الكالور Callose

- أزرق الأنيلين Anilin blue

- الريزوكرين الأزرق (متخصصة) Resocrin blue

يُحمل اللون بالشق القاعدى بالصبغة القاعدية (basic) وبالشق الحامضى بالصبغة الحامضية (Acid) ، وكقاعدة عامة تستعمل الصبغة القاعدية فى صبغ التراكيب النووية Nuclear structures وفى بعض الحالات الجدر الملجنة . أما الصبغات الحامضية فتستعمل فى صبغ السيتوبلازم والجدر غير الملجنة .

ويستعمل بعد الصبغ بعض المروقات مثل زيت القرنفل Clove oil و زيت الليمون Wintergreen oil وزيت البرتقال Bergamot oil وزيت الخضر الشتى Cedar oil وتستعمل هذه الزيوت عادة مركزة كما تشتري أو تخفف بقليل من الزيلول Xylene . كما يستعمل المروق Carbol xylene وهو رخيص الثمن ويقوم بالعملية على أحسن وجه ويتكون من حجم من الفينول المنصهر مخلوطاً بثلاثة أو أربعة حجوم من الزيلول .

### صبغ قطاعات شمع البارافين Staining paraffin sections

تصبغ القطاعات باستعمال صعة مفردة ، أو مزدوجة ، وأحياناً تستعمل ثلاث أو أربع صبغات ، وفيما يلى بعض الأمثلة لهذه الأنظمة من الصبغات ، مع وجود جدول يوضح الخطوات المتتالية لكل طريقة للصبغ ، يصبح بتكثيره ووضعه أمامك على جدران المعمل للاستعانة به أثناء إجراء عملية للصبغ

## أولاً: الصبغة المفردة

مثال ذلك صبغة الهيماتوكسلين سواء كانت ذاتية المظهر أو منفصلة المظهر ، وفيما يلي طريقة استخدام كل منهما :

### (١) صبغة الهيماتوكسلين (ذاتية المظهر) Mayer's Hemalum Hematoxylin

يستعمل فى هذه الحالة صبغة من التى يوجد المظهر مختلطاً بها Self-mordanting type ( جدول ٨-٣ أ و ب ) وهى تستعمل أساساً فى صبغ الجدر السليولوزية والبكتين وميسيليوم الفطريات وتستخدم أيضاً فى صبغ النوايات فى طور السكون كما يمكن أن تستعمل منفردة فى صبغ الأنسجة المرستيمية أو التى بدأت فى التميز .

يتحول لون الأنسجة بعد صبغها بالهيماتوكسلين وغمسها فى ماء الخنفية من اللون الأرجوانى Purple إلى الأزرق Blue وتعطى لوناً إرجوانياً محمراً ، إذا غمست فى ماء حامضى ، وأزرق إذا غمست فى ماء قلوى . ويفضل اللون الأزرق ، وإذا لم يظهر هذا اللون بعد غمس الشرائح فى ماء الخنفية فيمكن استعمال ٠.١٪ من كربونات الصوديوم لإظهار هذا اللون .

يراعى عند فحص الشرائح أن تكون النوايات ذات لون أسود مزررق ، والجدر السليولوزية لونها أسود ، أما الجدر الملحنة فتكون عديمة اللون تقريباً ، وابلاستيدات بلون أزرق خفيف إلى أسود مزررق ولستوبلازم رمادى مزررق .

إذا فحصت الشريحة وهى فى الماء بعد صبغها ، ولم تظهر الألوان سابقة لذكر نعاد الشريحة إلى الصبغة لفترة أخرى حتى تأخذ الألوان المطلوبة ، وإذا تركت الشريحة أكثر من للارم فى الصبغة ، وصار لونها أسود ، فمن الممكن إزالة الزائد من الصبغة بنمها فى محلول حامضى خفيف (٥.٠٪ حامض هيدروكلوريك أو ١٪ حامض ستريك ، أو محلول مائى مشبع لحامض البكريث) ثم تغسل بالماء ، وتغمس فى محلول قلوى للتعاادل وتمحص .

جدول ( ٨ - ١٣ ) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين دتية المظهر .

المدة بالدقيقة	المحلول	٢
٥ - ٢	ريلول نقي	(١)
٥ - ٢	ريلول وكحول مطلق (١.١)	(٢)
٥ - ٢	كحول مطلق (١)	(٣)
٥ - ٢	كحول مطلق (٢)	(٤)
٥ - ٢	كحول ٩٥ ٪	(٥)
٥ - ٢	كحول ٧٠ ٪	(٦)
٥ - ٢	كحول ٥٠ ٪	(٧)
٥ - ٢	كحول ٣ ٪	(٨)
٢ - ١	ماء مقطر	(٩)
٣ - ٢	صبغة الهيماتوكسلين	(١٠)
١	ماء مقطر	(١١)
١	ماء الصنوبر لإزالة الزئبد من الصبغة	(١٢)
٥ - ٢	كحول ٣٠ ٪	(١٣)
٥ - ٢	كحول ٥ ٪	(١٤)
٥ - ٢	كحول ٧ ٪	(١٥)
١ - ٥	كحول ٩٥ ٪	(١٦)
١ - ٥	كحول مطلق (١)	(١٧)
١٠ - ٥	كحول مطلق (٢)	(١٨)
١٠ - ٥	ريش قرغل (مروق)	(١٩)
٥	ريلول (١)	(٢٠)
٥	ريلول (٢)	(٢١)
٥	ريلول (٣)	(٢٢)
	التحميل والتغطية (يستخدم في التحميل كذا بلسم أو أى بيئة تحميل أخرى)	(٢٣)



**STAINING CHART**  
Progressive Hemalum

Xylene	resin and
2-5 min	Cover glass
(de-waxing)	↑
↓	xylene III
absolute	5 min
(anhydrous)	↑
alcohol	xylene II
2-5 min	5 min
↓	↑
95 %	xylene I
alcohol	5 min
2-5 min	↑
↓	carbol-
70 &	xylene
alcohol	5-10 min
2-5 min	↑
↓	absolute
50 %	alcohol II
alcohol	5-10 min
2-5 min	↑
↓	absolute
30 %	alcohol I
alcohol	5-10 min
2-5 min	↑
↓	95 %
distilled	alcohol
water	5-10 min
1-2 min	↑
↓	70 %
Hemalum	alcohol
2-30 min	5-10 min
↓	↑
distilled	50 %
water	alcohol
1 min	5-10 min
↓	↑
Tap water	30 %
↓	alcohol
→	2-5 min

جدول ( ٣٨ ب ) خطوات لصبغ باهيماتوكسليين ذاتية المظهر

Mayer's Hemalum Hematoxylin (ساس ١٩٦١)

## (ب) صبغة الهيماتوكسولين (منفصلة المظهر)

## Heidenhain's iron alum Hematoxylin

وهي من أهم الصبغات المستخدمة في الأغراض السيولوجية . كما تعد أيضاً من أكثر الصبغات استعمالاً في طريقة السللويدن (جدول ٨-٤) .

## خطوات الصبغ :

المدة بالدقيقة	المحلول
٥ - ٢	(١) زيلول نقي
٥ - ٢	(٢) زيلول وكحول مطلق (١ / ١)
٥ - ٢	(٣) كحول مطلق
٥ - ٢	(٤) كحول مطلق
٥ - ٢	(٥) كحول ٩٥ /
٥ - ٢	(٦) كحول ٧٠ /
٥ - ٢	(٧) كحول ٥٠ /
٥ - ٢	(٨) كحول ٣٠ /
٢ - ١	(٩) ماء مقطر
٦٠ (إلى اليوم التالي)	(١٠) ٤ / شب لحديد (مظهر)
١	(١١) ماء مقطر (٥ تغييرات)
٦٠ (إلى اليوم التالي)	(١٢) ١٠ / صبغة هيماتوكسولين
	(ترك العينات بالصيغة نفس فترة وجودها بالمظهر)
١	(١٣) ماء مقطر (٣ تغييرات)
	(١٤) ٢ / شب لحديد (التمييز)

ترك الشرائح ٥ دقائق ، تأخذ القطاعات لوناً اسود رمادياً ، تناع القطاعات بالمحضر المجهرى حتى يصبح لون السيترولازم رمادياً والنويات سوداء ، ترك لقطاعات معمورة في محلول شب الحديد . ولعنصر الوقت دور هام في هذه الخطوة حيث تتميز الأنسجة بسرعات مختلفة . لذلك تلزم دقة الملاحظة ، وعموماً يلزم لغاية الشرائح نحو ١ دقائق للتمييز ، وإذا كان تميز الخلايا سريعاً يستعمل محلول ١ / شب الحديد

٥	(١٥)	ماء صبور لإزالة شب الحديد ، يعطي وجوده لوناً باهتاً للتطاعات
٥ - ٢	(١٦)	كحول ٣٠ ٪
٥ - ٢	(١٧)	كحول ٥٠ ٪
٥ - ٢	(١٨)	كحول ٧٠ ٪
١٠ - ٥	(١٩)	كحول ٩٥ ٪
١٠ - ٥	(٢٠)	كحول مطلق (١)
١٠ - ٥	(٢١)	كحول مطلق (٢)
٥	(٢٢)	ریت قرفل (مروق)
٥	(٢٣)	ريتلون نقي (١)
٥	(٢٤)	ريتلون نقي (٢)
٥	(٢٥)	ريتلون نقي (٣)
	(٢٦)	التحميل والتغطية

**ملحوظة :** يمكن أن يتطلب الأمر استخدام صبغ مزدوج إضافة صبغة البرتقالي الذهبي Golden orange عقب خطوة الكحول ٩٥ ٪ وتركب من .

١ جم صبغة البرتقالي الذهبي

١٠٠ مل كحول إيثيل ٩٥ ٪

٤ مل حامض هيدروكلوريك (0.1 N) .

# STAINING CHART

## Iron Hematoxylin

تتبع الخطوات سالفة الذكر

حتى الوصول إلى

صبغة الهيماتوكسيلين

4% iron alum  
4 hr.  
↓  
dist. water  
5 changes  
1 min. intervals  
↓  
hematoxylin  
4 hr.  
↓  
dist. water  
3 changes  
↓  
destaining reagent  
until differentiated  
↓  
dist. water  
3 changes  
↓  
running  
tap water  
5 min. —

resin and  
cover glass  
↑  
xylene III  
↑  
xylene II  
↑  
xylene I  
↑  
carbol  
xylene  
↑  
absolute  
alcohol II  
↑  
absolute  
alcohol I  
↑  
95%  
alcohol  
↑  
70%  
alcohol  
↑  
50%  
alcohol  
↑  
30%  
alcohol

جدول ( ٨ ) . خطوات الصبغ بالهيماتوكسيلين مفصلة المظهر

Heidenhain's iron alum Hematoxylin

الفترة الزمنية كما في جدول (٨-٣)

(ساس ١٩٦١)

## ثانياً: الصبغ المزدوج

يقصد به استعمال صبتين يقوم كل منهما بتلوين نسيج أو أكثر ، ولذا تظهر كل الأنسجة بوضوح وبصح الدراسة ونغز لتكوين مرأ يسراً . وتوجد طرق عديدة لكثرة ما يوجد من صبغات ، ولكن سنقتصر على ذكر أكثرها شيوعاً مثل :

## (١) صبغة الهيماتوكسيلين والإيثروسين Hemalum and Erythrosin

تستعمل صبغة الإيثروسين في هذه لطريقة كصبغة مصادرة Counterstain وهي تساعد على التمييز بين الأنسجة وبعضها لبعض لوجود تفاوت في اللون بينهما ، ويحب ملاحظة

أن الصبغة المضادة لا تكون من الصبغات عالية التخصص بل تكون محدودة التخصص ،  
وتساعد على الرؤيا نتيجة لاختلاف اللون بالنسبة للصبغة الأساسية ، تتلون الخلايا الملجئة  
والنويات باللون الأسود بينما تتلون الجدر السيلولوزية باللون الأحمر الوردى أو الغرغلى .  
يمكن فى هذه الطريقة الاستعاضة عن الإريثروسين بالصبغات الآتية Fast green - Eosin  
Light green - Golden orange - مع بقاء الهيماتوكسلين كصبغة أساسية .

### خطوات الصبغ

تستعمل الخطوات السابق ذكرها فى طريقة اصبغ بالهيماتوكسلين ذاتية المظهر حتى  
نصل إلى صبغة الهيماتوكسلين ، وتوضع الشرائح فى هذه الصبغة المدة اللازمة ثم ننقل إلى  
كحول ٣٠ / ثم إلى كحول ٥٠ ٪ ثم إلى كحول ٧٠ ٪ ثم إلى كحول ٩٥ ٪ ثم إلى  
صبغة الإريثروسين (٥ ر ٪ فى كحول ٩٥ ، أو يمكن استعمال ٠.٥ / فى زيت القرنفل) ثم  
ننقل إلى كحول مطلق (تغييرتين) ثم إلى كربول ديلن Carbol xylene ثم إلى ريلول  
(تغييرتين) مع مراعاة نفس الفترات بالخطوات المتتالية ثم التحميل والتغطية (حدود ٨ ٥) .

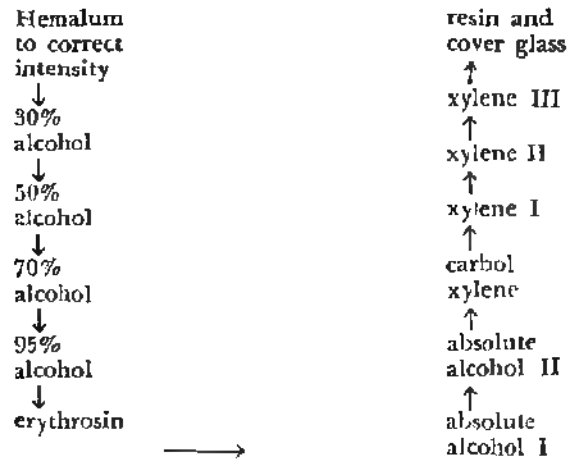
تتبع الخطوات سابقة الذكر

حتى الوصول إلى

صبغة الهيماتوكسلين

### STAINING CHART

Hemalum With "General" Counterstain



جدول (٨ ٥) : حصوات الصبغ بالهيماتوكسلين والإريثروسين

لفترات الزمنية كما فى جدول (٨ - ٣) (ساس Sass ١٩٦١)

## (٢) صبغة الهيماتوكسلين والسفرانين Hemalum and Safranin

تأخذ الخلايا المنجسة لوناً أحمر رافقاً وواضحاً ، أما الخلايا غير الملجنة فيكون لونها أزرق في نهاية عملية الصبغ وقبل التحميل ، وقد تأخذ البلاستيدات الملونة اللون الأزرق أو البنفسجي أو الأحمر . إذ ظهر أن لون السفرانين أقل مما يجب أو أكثر مما يجب فيمكن إعادة الشريحة إلى لسفرانين لزيادة اللون أو إزالة الزائد من السفرانين بالإذابة في أحد التركيزات العالية للكحول (وجد أن كحول ٩٠ / ١٠ ذات قدرة ضعيفة على إزالة الصبغة) ، إذا كان لون لسفرانين أكثر من الحد المطلوب يمكن ترك الشريحة في خليط من الزيموفينول مدة تتراوح بين ٤ إلى ١٢ ساعة ، فقد ثبت أن هذا المحلول له تأثير بسيط جداً في إزالة الزائد من السفرانين ، ولذا نترك الشريحة فيه مدة طويلة دون خوف من اختفاء لصبغة (جدول ٨-٦)

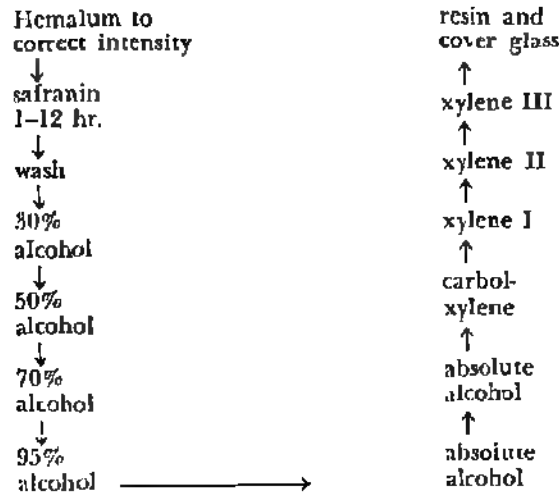
تتبع خطوات مألوفة الذكر

حتى لوصول إلى

صبغة الهيماتوكسلين

### STAINING CHART

Hemalum and "Specific" Counterstain



جدول (٨-٦) : خطوات الصبغ بالهيماتوكسلين والسفرانين

الفترات الزمنية كما في جدول (٨-٣) (ساس ١٩٦١)

## خطوات الصبغ

بعد الوصول بالشريحة إلى صبغة الهيماتوكسلين توضع فيها للمدة اللازمة ، ثم نقل الشريحة بعد ذلك إلى السفرائين ( ١ ٪ فى الماء) لمدة ١-١٢ ساعة ، تنقل بعدها إلى الماء (غسيل) ثم إلى كحول ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ ثم ٧٠ ٪ ثم ٩٥ ٪ ثم كحول مطلق مرتين ثم إلى كاربول زيلين ثم زيلول مرتين ثم التحميل والتغطية

### (٣) صبغة السفرائين والأخضر السريع Safranin and Fast green

وهى الطريقة القياسية Standard method والأكثر استخداماً مع الأنسجة النباتية للتمييز بين الأجزاء الملجنة والسلولوزية من جدر الخلايا ، وتجرى بتمرير الشريحة فى أوانى الصبغ المختلفة حتى الوصول إلى الماء ثم تنقل إلى السفرائين المائى ( ١ ٪ فى الماء لمفطر) لمدة ١ ١٢ ساعة ثم تنقل الشريحة إلى الماء أو تترك مع تغيير الماء حتى يصبح الماء غير ملون ، ثم تنقل إلى كحول ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ ثم ٧٠ ٪ ثم ٩٥ ٪ ثم إلى الأخضر السريع ( ١ ٪ فى كحول ٩٥ ٪ ) وتترك لمدة ٥ - ٣٠ ثانية ، تنقل بعد ذلك إلى كحول مطلق مرتين ثم إلى كاربول زيلين ثم إلى زيلول مرتين ثم التحميل والتغطية (جدول ٨-٩).

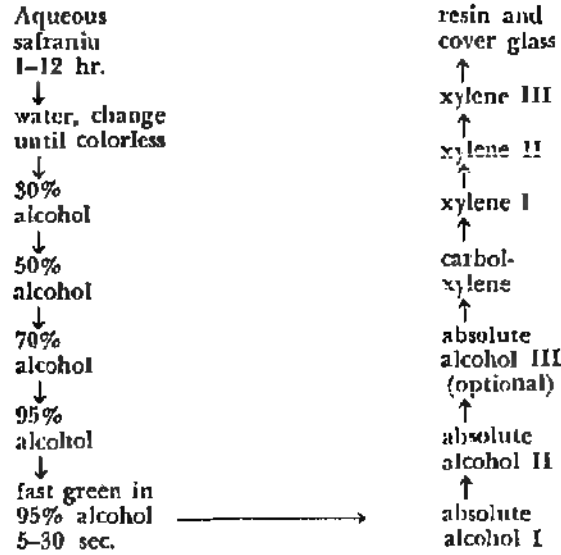
تتأثر كل من الصبغتين المستعملتين بالكحول أثناء التحفيف وذلك لقابليتهما للذوبان فى الكحول . كما تؤثر كل منهما على الأخرى ، ولذا فطريقة الصبغ بهاتين الصبغتين تحتاج إلى دقة ومراعاة وخبرة كافية وفى النهاية يجب أن تكون الخلايا المدججة والكروماتين والنوية وأحياناً الكيوتين ذات لون أحمر لامع والبلاستيدات الخضراء قرنفلية اللون إلى حمراء والجدر السلولوزية والسيتوبلازم ذات لون أخضر .

إد. كان الأخضر السريع يريل لون السفرائين نتيجة لتركيزه الرائد فيمكن تخفيف محلول الصبغة بنسبة ١ : ٥ من كحول ٩٥ ٪ . وإذا كان لود السفرائين لازل فى الجدر السلولوزية رغم صبغة الأخضر السريع فيمكن إعادة الشريحة إلى الأخضر السريع ومصاعة المدة السابقة ثم تجفيفها . إذا ظهر بعد الفحص أن السفرائين ضعيف يعاد صبغ الشريحة من البداية كأنها لم تصبغ من قبل .

تبع خطوات سائلة الذكر  
حتى الوصول إلى الماء

### STAINING CHART

Safranin-Fast Green



جدول (٧-٨) . خطوات الصبيغ سافرانين والأخضر السريع

الفترة الزمنية كما في جدول (٨-٣) (Sass ١٩٦١).

يمكن أن يحل محل الأخضر السريع الصبغات الآتية : الأخضر الضوئي - أخضر المالاكيت - أو صبغة مصادرة زرقاء مثل أزرق الأنيلين أو البنفسجي لمتيور أو أزرق الميثيلين وكل هذه الصبغات تدوب في كحول ٩٥ ٪ أو في كحول ٥ / ١ أو في زيت القرفل وتدرج ضمن الخطوات السابق ذكرها في الموضع المناسب لتركيز المذيب .  
وتحضر المحاليل المستعملة كم يلي .

#### صبغة السفرانين :

يدب ١ جم صبغة سافرانين في ١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥ ٪ ، وعند الاستعمال يحتف بالمحلول بالماء المقطر (١:١) .



## صبغة الاخضر السريع :

٥٠ جم صبغة أخضر سريع

٥٠ مل زيت قرنفل

٥ مل كحول مطلق

## محلول الترويق :

٥٠ مل ريب قرنفل

٢٥ مل كحول مطلق

٢٥ مل ريلول نقي

## (٤) صبغة الإريثروسين والبنفسجي المتبلور Erythrosin and Crystal violet

تفضل هذه الطريقة إذا كان نسيج احشب حديثاً أو ضعيف التلجنن تمرر الشريحة حتى تصل إلى الماء ثم ينقل إلى لبنفسجي المتبلور ( ١ / فى الماء ) لمدة ١٥ دقيقة ثم تغسل فى الماء وتنقل إلى كحول ٣٠ / ثم ٥٠ / ثم ٧٠ / ثم ٩٥ / ثم إلى كحول مطلق ثم تنقل إلى صبغة الإريثروسين لمدة ١-٢ دقيقة ثم تنقل إلى ٥٠ / زيلول ثم إلى ريلول نقي ٢-٣ مرات ثم لتحميل والتغطية (جدول ٨-٨) .

تحضر صبغة الإريثروسين بإذابة ٢ جم من الصبغة فى ٢٥ مل كحول مطلق ثم يضاف إلى المحلول ٧٥ مل زيت قرنفل .

هذه الطريقة تحتاج إلى ملاحظة ودقة فائقة وافحص بعد الصنع بالإريثروسين حيث يحل محل البنفسجي المتبلور فى الأنسجة المصبغة ونتيجة لصنع تكون الخلايا المصبغة ذات لون بنفسجي لامع والجدر السليولوزية ذات لون أحمر وردى . ويراعى التخلص تماماً من آثار زيت القرنفل حتى لا يتأثر لون الأنسجة ويذول مع الوقت ، فضلاً عن ظهور نقط زيتية عند فحص الشريحة .

## STAINING CHART

### Crystal violet - Erythrosin

تتبع الخطوات سالفة الذكر

حتى لوصل إلى الماء

aqueous Crystal violet 15 min ↓	resin and cover glass ↑
rinse in water ↓	xylene III ↑
30 % alcohol ↓	xylene II ↑
50 % alcohol ↓	xylene I ↑
70 % alcohol ↓	clove oil +
95 % alcohol ↓	xylene ↑
absolute alcohol ↓	clove oil
erythrosin 1 2 min	

جدول (٨ ٨) . خطوات الصبغ بالإنثروسين واسفسجى المتبلور

الفترة الزمنية كما في جدول (٨-٣) (Sass ١٩٦١) .

#### (٥) صبغة البنفسجى المتبلور والايودين Crystal Violet-Iodine

تعرف بطريقة نيون Newton وهى من الصبغات الهامة لئى تستعمل فى الأغراض  
السيتولوجية (جدول ٨ ٩) . فى هذه الطريقة تترك الشريحة حتى تصل إلى الماء ثم صبغ  
الشريحة فى محلول اليود (IKI) لمدة ١٥ دقيقة ، بعد ذلك تغسل إلى الماء لفترة بسيطة ثم  
تنقل الشريحة إلى البنفسجى المتبلور (٢٥-٥٠ ر. ل. فى الماء) لمدة ١-٤ ساعات . تغسل  
الشريحة فى الماء ثم تغسل إلى محلول يود آخر لمدة ١٥ دقيقة ثم تشطف فى الماء ، تنقل  
الشريحة إلى حمض البكريك فى كحول ٥٠ ل. (شبع ٥٠ ٧ كحول بحامض البكريك) لمدة

٣٠ ثانية ، ثم تنقل إلى كحول ٩٥ ٪ لمدة ١٠-٦٠ ثانية ، ثم كحول مطلق لمدة ٣ ثانية مرتين ، ثم تنقل الشريحة إلى إماء يحتوى على كحول مطلق وزيلول وريت السيدر بنسبة ثلث لكل منهم لمدة ٣٠ - ٦٠ ثانية. نختبر الشريحة ثم تنقل إلى زيلول مرتين، ثم تحمل وتغطى. فى هذه الطريقة تصبغ الكروموسومات باللون الأزرق المسود فى وسط غير ملون .

يحضر الأيودين بوتاسيوم أيوديت (IKI) كما يلى :

١٠٠ مل ماء + ١ جم يودور بوتاسيوم + ١ جم يود

تخصص أوانى التجفيف فى هذه الطريقة ؛ أى لا تستعمل الكحولات المختلفة فى غرض آخر حتى لا يحدث تلوث بصيغة أخرى فتضر بالعملية . عند الوصول إلى الكحول ٩٥ ٪ يجب الإسراع طالما كانت الصبغة لا تلون الخطوات التالية بشكل واضح . يستعمل زيت لسيدر حتى يقلل التبخير أثناء الفحص . إذا ظهر لون أزرق فى السيئويلازم تعاد الشريحة إلى الكحول وإذا ظهرت الكروموسومات بلون باهت يعاد صبغها من البداية .

### STAINING CHART

Crystal (Gentian) Violet-Iodine

تبع الخطوات سألقة الذكر

حتى الوصول إلى الماء

IKI  
15 min.

↓  
rinse in water

↓  
crystal violet  
1-4 hr.

↓  
rinse

↓  
IKI  
15 min.

↓  
rinse

↓  
50% alcohol  
picric acid  
30 sec.

↓  
95%  
alcohol  
10-60 sec.

resin and  
cover glass

↑  
xylene III

↑  
xylene II

↑  
xylene I

↑  
examine

↑  
[ 1/3 absolute alcohol  
1/3 xylene  
1/3 cedar oil  
30-60 sec.

↑  
absolute  
alcohol II  
30 sec.

↑  
absolute  
alcohol I  
30 sec.

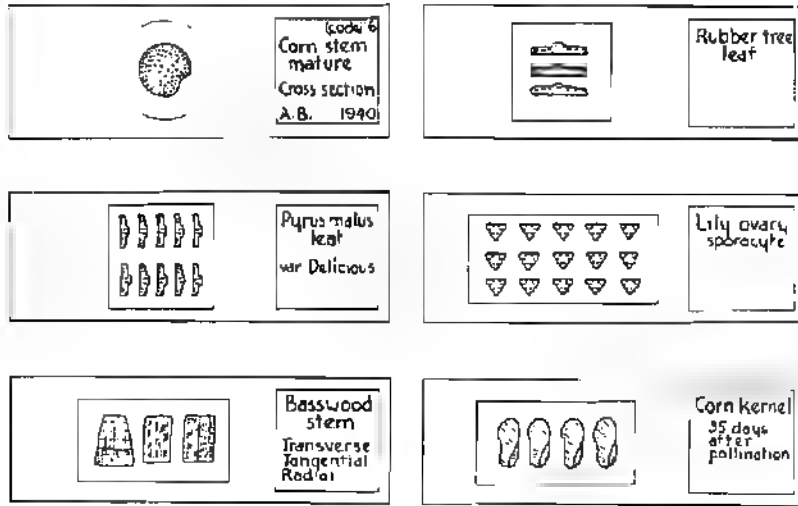
جدول (٨-٩) . خطوات لصبغ بالبفسجى المتبلور والايودين

الفترات الزمنية كما فى جدول (٨-٣) (ساس ١٩٦١).

## ٩ . التحميل والتغطية

### Mounting and Covering

تستعمل في ذلك أغطية نظيفة حافة بحيث تناسب اتساع انقطاع أو انقطاعات (شكل ٩-١) ويحدث في العادة تحول في لون بيئة التحميل ويحول لون القطاعات بالتحزين من الخارج إلى الداخل أى من حافة الغطاء إلى الداخل ، ولذلك يستحسن أن يترك حوالى ٥ سم بين القطاعات وحافات لغطاء .



شكل (٩-١) . تحميل وتغطية القطاعات ، ووضع بطاقة السات على الشريحة ، لاحظ التناسب بين حجم وعدد القطاعات وغطاء الشريحة المستخدم .

ويستعمل في التحميل عدة بيئات مختلفة أهمها ما يلي :

#### (١) كندا بلسم Canada balsam

يحصل عليها من نبات *Abies balsamea* من مخروطيات ، وتعتبر أكثر المواد استخداماً منذ زمن بعيد ، وتظل لقطاعات المحملة فيه ما يقرب من ٢٥ سنة بحالة مرصية

تماماً ، ويراعى عدم تعريض لشرائح لدرجات حرارة مرتفعة أو ضوء شديد ؛ حتى لا تتأثر وتصبح غامقة اللون ، ويحسن حفظ الكندا بلسم فى زجاجات غامقة اللون أو فى أماكن مظلمة .

## (٢) دamar بلسم Dammar balsam

يبتاز عن الكندا بلسم بعدم تأثر ألوان القطاعات المحملة فيه .

## (٣) Euparal يوبرال

يوجد على صوريين ، فقد يكون عديم اللون ، وقد يضاف إليه لون أخضر Euparal vert وذلك لاحتوائه على أحد أملاح المحاس ، ويستعمل فى تحميل القطاعات المصبوعة بالهيماتوكسلين ، تنقل القطاعات من الكحول ٩٥ ٪ أو ١٠٠ ٪ إلى بيئة التحميل مباشرة أو من مذيب ليثة إلى بيئة التحميل (ويسمى Essence d'euparal)

## (٤) Amann's medium اللاكتوفينول

ويحضر كما يلى :

٢٠ جم	حامض الكربوليك (فينول بدلولرات)
٢ جم	حامض اللاكتيك
٤٠ مل	جلسرين
٢٠ مل	ماء مقطر

ويستعمل إما رائقاً أو مضافاً إليه إحدى الصغيات الحامضية المناسبة (بنسبة ١ ر ٥ أو ١ ر ٤) وغالباً ما يضاف صبغة أزرق القطن Cotton blue .

## (٥) Glycerine jelly غروى الجلسرين

ويحضر كما يلى :

١ جزء	جيلاتين
٦ جزء	ماء
٧ جزء	جلسرين
١ جم لكل ١٠ مل من المخلوط السابق	فينول

ينقع جيلاتين في الماء لمدة ساعتين ثم يضاف الجلسرين ثم الصينول - يسخن المخلوط لمدة ١٥-٢٠ دقيقة (دون غليان) مع التقليب حتى يصير المخلوط سائلاً رائقاً متجانساً ، يرشح المخلوط وهو ساخن خلال موسدين ضيق الثقوب .

#### (٦) الراتنجات الصناعية Synthetic resins

توجد بعض لراتنجات التي تنتج صناعياً تفوق في جودتها الكددا بلسم مثل Clarite وهو عديم اللون متجانس التركيب سريع الجفاف - ويستعمل في تحميل القطاعات النباتية بتركيز ٨٠ ٪ في الزيلول .

#### خطوات إجراء التحميل والتغطية

يتم التخلص من محلول الزيلول الزائد على الشريحة بإمالتها واستقبال ما يزيد من الزيلول على ورقة ترشيح أو قطعة من القماش ، توضع نقطة من بيئة التحميل أو أكثر تبعاً لمساحة الغطاء (مع مراعاة السرعة في إجراء هذه الخطوة حتى لا تجف القطاعات) ، توضع حافة الغطاء مستندة إلى الشريحة والغطاء مائلاً بزاوية ٤٥° تقريباً ، يترك الغطاء ليهبط ببطء على بيئة التحميل مستنداً إلى طرف إبرة التشريح حتى يستقر تماماً فوق الشريحة ، مع التخلص تماماً من أية فقاعات هوائية في بيئة التحميل ، ويراعى أن يكون الغطاء المستعمل جافاً تماماً وذلك بتسخينه على لهب ضعيف ، ويفضل إجراء التحميل فوق سطح أسود اللون حتى يسهل رؤية فقاعات الهواء التي قد تتكون أثناء إجراء هذه العملية .

يراعى أن لا تزيد كمية بيئة التحميل عن اللازم حتى لا تسيل على حواف الغطاء وأحياناً فوقه ، تجفف الشرائح بعد ذلك بوضعها في فرن على درجة حرارة ٣٥-٤٠ °م لمدة يوم أو أكثر حتى تمام جفاف بيئة التحميل ؛ ليتمكن تداول الشرائح دون خوف من انزلاق الغطاء . إذا كانت بيئة التحميل المستعملة غروى الجلسرين أو اللاكتوفيلول فلا توضع الشرائح بالفرن .

## ١٠ . دراسات تشريحية خاصة Special anatomical Studies

يتناول الجزء التالى عرضاً لبعض الطرق المبعة فى دراسات معينة تختص بموضوعات محددة مثل :

### اولاً : تفكيك نسيج الخشب Maceration of wood

تفكيك الأنسجة طريقة كيميائية لفصل الوحدات التى تتكون منها الأنسجة النباتية . وذلك بإذابة المادة اللاصقة بين الخلايا ، والهدف من تفكيك أى نسيج هو تكوين صورة دقيقة ثلاثية الأبعاد لطرز الخلايا المكونة للنسيج . ويتم ذلك بالطريقة التالية :

(١) تقطع العينة الخشبية - مستعمل شفرة حادة إلى أجزاء صغيرة على هيئة شظايا لا يزيد حجمها عن تلك المستخدمة فى تنظيف الأسنان Toothpick .

(٢) توضع شظايا الخشب فى وعاء زجاجى له عطاء زجاجى به محلول إميغ لتفكيك الأنسجة Emig's macerating fluid ويتركب من :

١٠ جم	ثلاثى أكسيد الكروميوم	Chromium trioxide ( $\text{CrO}_3$ )
٩٠ مل	ماء مقطر	Distilled water
١٠ مل	حامض نيتريك	Nitric acid ( $\text{HNO}_3$ )

(٣) يوضع الوعاء المحتوى على العينة والمحلول داخل فرن درجة حرارته  $50^\circ\text{C}$  م حتى تأخذ العينة شكلاً مفككاً Fuzzy ويتطلب ذلك نحو ساعتين .

(٤) يسكب الحامض بعيداً عن العينة وتغسل الألياف جيداً بماء الصنبور ، ثم تخلط لعينة كمية من ماء ويعلق الوعاء بإحكام ، يرفع الوعاء جيداً لفصل الخلايا عن بعضها . إذا لم تنفصل الخلايا بسهولة يخلط مع العينة كريات من الزجاج للمساعدة على تفكيك الخلايا .

(٥) تعمل الألياف بعدية عدة مرات لفترة نحو ٢٤ ساعة بماء الصنبور ، مع الإحتراس من فقد الخلايا الصغيرة بعد تفكيكها . قد يعرض النعش لمحول لعملية الطرد المركزي حتى يسهر الحفاظ على خلايا المفككة .

### الصبغ Staining

(١) تدرج بالمحلول من الماء حتى يصل إلى كحول إيثايل ٥٠ ٪ خلال عملية Dehydration لفترة ٥ دقائق لكل تركيز .

(٢) تجهز صبغة سفرنين كما يلي

سفرانين ١ حم

كحول إيثايل ٩٥ ٪ ١٠ مل

تحفف عند الاستعمال بماء مقطر بنسبة ١ : ١ .

(٣) تترك العينة في صبغة لسفرانين مدة ساعة .

(٤) تشطف العينة سريعاً في كحول إيثايل ٧٠ ٪ .

(٥) تمرر العينة في كحول إيثايل ١٠٠ ٪ (مطلق) مدة دقيقة ، مرتين .

(٦) تمرر العينة في كحول مطلق + زيلول (بنسبة ١ : ١) لمدة ٢ دقيقة .

(٧) تمرر العينة في زيلول نقي I لمدة ٥ دقائق .

(٨) تمرر العينة في زيلول نقي II لمدة ٥ دقائق .

(٩) توضع نقطة من كندا بلسم على شريحه - تؤخذ حزمة صعيبة من الألياف بواسطة الملفظ وتوضع فوق الكندا بلسم مع توريعها حتى لا تبدو تحت المجهر متزاحمة ، تعطى بغصه شريحة برفق ، وتحفف الشريحة .

### ثانياً: دهك الأنسجة (طريقة الاستوكارمين) Smearing

تدهك الأنسجة في حالة استعمال لاسيتوكارمين في الصبغ وهي طريقة شائعة الاستعمال ، ويتبع في صبغ الأنسجة عدة صبغات ولكن أكثرها شيوعاً هي طريقة



الاستوكرمين وهى طريقة سريعة ؛ إذ يتم فيها القتل والتثيت وصنع الأنسجة المعامدة دفعة واحدة . وتستعمل التحصيرات الحديثة لعد الكروموسومات وارتباط بعضها ببعض ودراسة تركيبها التفصيلى ، ويمكن تحويل الشرائع من الحالة المؤقتة إلى المستديمة لإمكان الرجوع إليها وقت الحاجة .

### تحضير الصبغة

كارمين  
حامض خليك ٤٥ ٪  
١ جم  
١٠٠ من  
٢ نقطة  
خلات الحديد (محلول مائى مشبع)

يذاب لكارمين فى حامض الخليك المغلى على حمام مائى ثم يبرد المحلول ويروق . يضاف محلول خلالات الحديد ويترك حوالى ١٢ ساعة ثم يرشح ويحفظ الناتج فى ثلاجة ، تحفظ كمية صغيرة فى زجاجة بقطارة فى المعمل للاستعمال اليومى . بعض المشتغلين يستغنون عن إضافة خلالات الحديد بالتفاعل الذى يحدث بين إبرة التشريح وحامض الخليك الموجود فى الصبغة ، ولكن ذلك يحتاج إلى مران لصبط لعملية لأن زيادة لحديد يعيق تمييز لكروموسومات بوضوح وقد يعطى روسب سوداء على شكل حبيبات لذا يفضل إضافة خلالات الحديد . وفى هذه الحالة تستعمل إبرة مطلاة بالنيكل أو الكروم أو إبرة زجاجية ذات سن مدب مناسب رفيع

وتجرى عملية الدهك إما فى المتك أو فى قمم لحدود . وفى حالة امتك تدهك المتك الغضة فى نقطة أو ثنتين من الصبغة ، وتدهك المتك الصغيرة كلها أما الكبيرة فتجرأ إلى قطع تدهك كل منها منفردة . تزال بعد ذلك الجدر ولأنسجة غير المرغوبة ، وتجرى هذه العملية تحت البينوكلر ، عند ذلك يمكن تغطية النسيج المتبقى على الشريحة بعطاء الشريحة وضغط عليه أو بنقر عليه برفق وذلك للحصول على طبقة رقيقة ، تمرر الشريحة بسرعة عدة مرات على لهب كحولى ويحترس من الغليان . يزال الزائد من الصبغة إن وجد ثم تغلق حافة القطع بشمع البارافين أو شمع البارافين بالمستكة بنسبة ١ : ١ ، تختبر الشريحة بالمجهر ثم تحفظ الشرائع مفردة فى ثلاجة فيتحسن المود بعد عدة أيام ويصل إلى كثافته القصوى ثم يأخذ فى لتدهور تدريجياً بعد ذلك ليس من ليسور الحصول على المتك

اللازمة في أى وقت لذا يجب جمعها أثناء الموسم وقتلها في محلول قتل مناسب ، ثم تحفظ في ثلاجة على درجة الصفر لعدة أشهر تبعاً لحالة كل نبات . بعض يفصل نقل التث إلى كحول ٧٠ ٪ بعد يوم أو يومين من القتل حتى يمكن حفظها لمدة طويلة في الثلاجة .

في حالة قمم الجذور يجب التركيز على الصور الاستوائى ، وتستحب بعض قمم الجذور لهذه العملية رغم كبرها وبذلك يمكن تحضير شرائح جيدة كما في حالة لبصل مثلاً بينما يقوم البعض الآخر عملية لدهك رغم صغره كما في الخندقوق . تقتل القمم لنامية للجذور في محلول قتل مناسب ويحسن أخذ الجزء المرستيمى مع جزء من منطقة الاستطالة ، وعند الدهك يفصل الجزء المرستيمى لإجراء العملية فقط . تترك النماذج في محلول القتل لمدة يوم على الأقل ثم تنقل من عملية لقتل إلى الدهك مباشرة أو إلى كحول ٧٠ ٪ إن تطلب الأمر الحفظ لمدة طويلة . سعد جراء الدهك واستبعاد الأنسجة غير المرغوب فيها والتقطعة بإعطاء تسخن على لهب ضعيف ويضغظ على العطاء حتى يتم إنقصاص الخلايا عن بعضها البعض وتصبح مسطحة تماماً . تميل أحياناً الكروموسومات إلى التجمع نتيجة عملية دهك قمم الجذور ، ويتنافى هذا مع الغرض من العملية ، ولكن يمكن التغلب على هذه الظاهرة بعمر القمم النامية للجذور في محلول مائى مشبع من Baradichlorobenzene لمدة ١ ٤ ساعات ثم تقتل في أى من محاليل القتل . ولقد وُجد أن محلول ١ - ٣ ٪ من كحول الميثايل يؤدي إلى نفس الغرض بدلاً من باراداي كلورونزين ويعطى مجموعات من الكروموسومات متباعدة نوعاً ، كما يمكن تسهيل تفكك الخلايا عن بعضها البعض بتحليل لصفحة الوسطى تحليلاً مائياً باستعمال ٥ - ١٠ ٪ من حامض الأبدروكلوريك (يخفف الحامض بما بالماء أو في ٧٠ ٪ كحول) . بعد المعاملة بالحامض ٥ - ٣٠ دقيقة تعاد اخذور إلى المثبت ويغير مره على الأقل (اقترح البعض استعمال الإنزيمات لإجراء هذه العملية)

يمكن تحويل اشرائح المؤقتة في عملية الدهك إلى مستديمة وذلك بحفظها في الماء ثم لتحميل في كند، بلسم أو أحد البتات الأخرى . ويمكن استعمال طريقة سيرس Ser's لسهولة وتتلخص في الآتى :

اغمس لشريحة مقلوبة وأسند أحد طرفيها إلى قضيب زجاجى في طبق بىرى ، يحتوى على حامض حليك وكحول بنسبة ٥٠ ٪ لكل منهما ، وذلك ينمصر غطاء لشريحة من تلفاء نفسه . أمرر الشريحة والعطاء في المحاليل الآتية مع تركها ٢ ٥ دقائق في كل منها

(١) كحول إيثايل + كحول ثلاثي البيوتانيل T.B.A. بنسبة ١ : ١ .

(٢) T.B.A نقي ، ثلاث تغييرات متتالية .

(٣) توضع الشريحة بحيث تكون الأنسجة لأعلى على ورقة الترشيح ، ثم توضع نقطة من البلسم بحيث يميل إلى السيولة أو أى بيئة تحميل أخرى على الأنسجة ، ثم أزل الغطاء بعناية مع وضع ثقل مناسب عليه .

### ثالثاً: الدراسة التشريحية للعقدة وعنق الورقة بواسطة القطاعات اليدوية

#### Free hand method for petiolar and nodal study

عند الرغبة فى عمل دراسة تشريحية مقارنة لمنطقة العقدة وقاعدة عنق الورقة ، ينصح باتباع الطريقة التالية للحصول على قطاعات يدوية :

(١) تتطلب العينات المجففة المعاملة بالغليان حتى يتم تطريتها Hydrate ، أما لعينات المحفوظة فى محاليل فليست فى حاجة لهذه الخطوة .

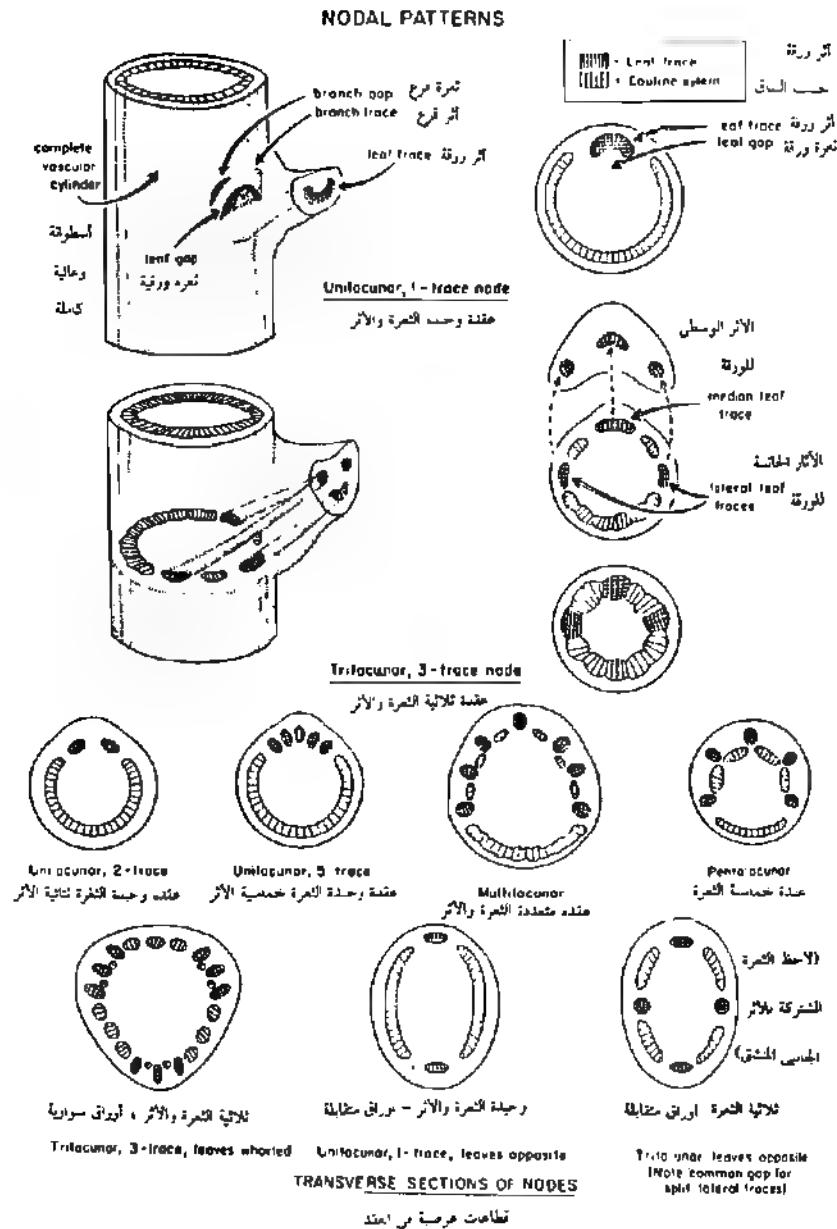
(٢) يجرى عمل قطاعات يدوية للمنطقة المطلوب فحصها باستعمال شفرة حادة ، مع الاستعانة بنخاع اليلسان أو جذر الحرر .

(٣) تستقبل القطاعات فى زجاجة ساعة بها محلول مائى مشبع من الكلوروجلوسينول Phloroglucinol ، ويكفى لذلك بضعة دقائق ، حيث يستخدم هذا المحلول لإظهار الأنسجة الملجنة خاصة فى لدراسات التشريحية المقارنة ، كما فى حالة دراسة مسار الحزم الوعائية Vascularization فى عنق لورقة وتحديد طرز العقدة بالساق .

(٤) توضع القطاعات مباشرة على شريحة ، مع إضافة حامض الأيدروكلوريك Hydrochloric acid وغصاء شريحة ، ترل الزيادة من الحامض خارج غطاء الشريحة .

(٥) تفحص لشريحة تحت المجهر ، مع الحرص لتمام من ملامسة الحامض للمجهر .

(٦) تظهر لانسجة فى احوال باللون الأحمر الأرجوانى Purple-red ، يحرى عمل رسم تخطيطى Sketch يوضح طراز الجهاز الوعائى ، يحلل الحامض الأنسجة سريعاً ، وتأخذ القطاعات لوناً باهتاً (شكل ١٠-١) .



شكل (١٠-١) : أنماط العقد (رادفورد Radford وآخرون ١٩٧٤).

## رابعاً: الطرق المتبعة لدراسة تشريح الورقة والزهرة

### Techniques employed in the study of leaf and flower anatomy

#### (١) إزالة اللون Clearing

بالإضافة إلى الطرق المعتادة لتقطيع بالميكروتوم عند دراسة تشريح الأوراق والأزهار ، قد تستعمل طريقة إزالة اللون Clearing التى تفيد كثيراً فى دراسة مسارات الأوعية Vasculation ، ويمكن إجراء هذه لطريقة مع العينات الغضة أو المحفوظة أو المجففة (المعشبة) ، وتجرى هذه العملية كما يلى :

(١) تؤخذ أجزاء نباتية صغيرة وتوضع فى طبق بترى (قد يتطلب الأمر كما فى حالة الأوراق تقطيع لعينة إلى أجزاء مناسبة الحجم) ، لا تحتاج العينات المجففة أو المحفوظة فى محاليل أى معاملات خاصة قبل البدء فى العمل ، ومع ذلك تغلى العينات الغضة فى كحول أو توضع فى محلول كارنوى لفترة للتخلص من الكلوروفيل قبيل عملية إزالة اللون .

(٢) تغمس العينة النباتية فى محلول ٥ ٪ أيدروكسيد صوديوم (أو أيدروكسيد بوتاسيوم) وتوضع فى فرن على درجة حرارة ٣٧° م لمدة يوم إلى عدة أيام تبعاً لطبيعة الأنسجة .

(٣) عندما تصبح العينة شفافة (أو تقريباً كذلك) تغسل بتلليل من الماء .  
قد تحتوى بعض العينات النباتية على أصباغ داكنة مختلفة يفضل إزالتها فى هذه المرحلة بغمسها فى محلول التبييض Stockwell's Bleach .

ويتروك هذا المحلول من :

Distilled water	٩ مل ماء مقطر
Potassium bichromate	١ جم بيكرومات البوتاسيوم
Glacial acetic acid	١٠ مل حامض خليك ثلجى
Chromic acid	١ جم حامض الكروميك

تترك العينة داخل هذا المحلول لفترة ساعة إلى عدة ساعات على درجة حرارة الغرفة حتى تمام زوال جميع الأصباغ ، بعد ذلك يسكب محلول التبييض وتغسل العينة جيداً .

(٤) قد يرى لبعض عند هذه المرحلة استعمال محلول Chloral hydrate مركز لاستكمال عملية إزالة اللون إن لم تصبح العينة شفافة تماماً ، وفى كثير من الحالات لا تكون هذه العملية ضرورية .

(٥) يبدأ بعد ذلك تجفيف العينة باستعمال كحول إيثايل ٣٠ ٪ ثم ٥٠ ٪ لمدة ٥ دقائق لكل منهما .

(٦) تجرى عملية الصبغ باستعمال السفرنين ١ ٪ فى كحول إيثايل ٥ ٪ ، ويكفى لذلك دقائق معدودات مع الرج برفق .

(٧) تستكمل عملية التجفيف فى كحول إيثايل ٧٠ ٪ و ٩٥ ٪ ، وهذه المحاليل قد تزيل الصبغة لذلك يراعى الحرص بعدم ترك العينات بها لفترة طويلة ، وفى نفس الوقت يراعى تمام عملية التجفيف .

(٨) تمرر العينة على كحول مطلق لعدة دقائق . لا تحدث إزالة كبيرة للصبغة مع التركيزات العالية من الكحول

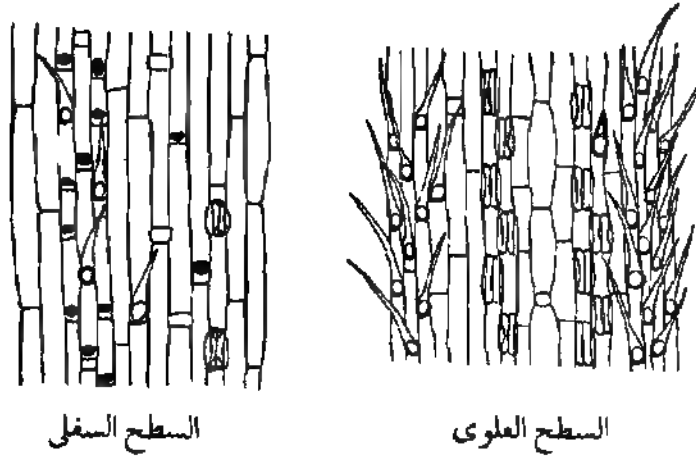
(٩) يستعمل بعد ذلك محلول من كحول مطلق وزيلول بنسبة ١ : ١ لعدة دقائق .

(١٠) يستعمل بعد ذلك زيلول نقى ، يدل تعكر الزيلول على عدم تمام التجفيف . وفى هذه الحالة تعاد العينة إلى الكحول المطلق .

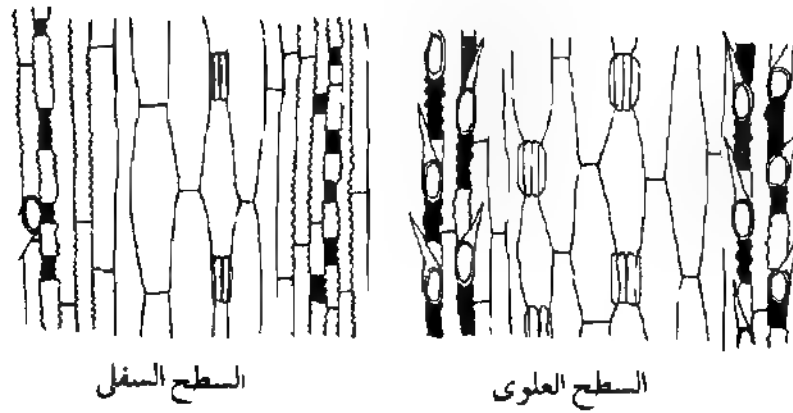
(١١) تجرى عملية التحميل فى لكندا بلسم - أحياناً يفضل الاحتفاظ بالأجزاء الزهرية فى أنبوبة لدراسة مسار الحزم الوعائية من جميع الأوجه .

### (ب) سلخ البشرة Epidermal peels

يمكن عمل سلخ فى ورقة غضة أو محفوظة باستعمال شفرة حادة ، وذلك بفصل الطبقة الصحية القريبة adaxial أو البعيدة abaxial ثم تحميلها فى ماء على الشريحة وفحصها تحت المجهر ، ولما كان هذا التحضير من النوع المؤقت فمن الأفضل عمل رسم تخطيطى للبشرة باستخدام كاميرا لوسيدا Camera lucida كما فى شكل (١٠-٢) .



*Vulpia alopecuroides*



*Vulpia tenuis*

100  $\mu$ m

شكل (١٠-٢) : الشرة لبعض النجيليات ، تظهر خلايا السيليكا باللون الأسود  
(ستاس Stace ١٩٨٤)

## خامساً: بعض الطرق المستعملة لتجهيز العينات التشريحية لأمراض النبات

### (١) الفطريات البيضاء Oomycetes

مثل جنس *Albugo* (شكل ١٠-٣) ، تنتحب بثرات حديثة غير متفجرة ، وتقتل وتثبت باستعمال محلول كراف Craff ويفضل الصمغ بواسطة Iron-Hemalum لإظهار نواة العطر كما يمكن استعمال لهيماتوكسيلين - سقرين أو سقرانين - أخضر سريع في حالة الجراثيم الجنسية Oospore تقتل وتثبت العينات بواسطة محلول F.A.A. وتتبع طرق لصنع العامة

تتبع الطرق السابقة الذكر أيضاً مع أمراض البياض الزغبى المسببة عن جنس *Peronospora* والندوة المتأخرة في الصمغاطم والبطاطس المسببة عن جنس *Phytophthora* (شكل ١٠ - ٣)

قد تتبع الطريقة التالية لصنع القطعات باللاكتوفينول الأخضر لإظهار لصبغات في الأنسجة المصابة :

(١) توضع العينة فى لاکتوفینول مخفف ( جزء لاکتوفینول + ٢ جزء ماء مقطر ) لمدة ١٠ دقائق .

(٢) يستبدل اللاكتوفينول المخفف بمحلول لاکتوفینول أحمر قوى (١٠ : ١) . يترك لليوم التالى معرضاً للهواء .

(٣) تغسل العينة فى لاکتوفینول رائق لإزالة الصبغة الزائدة ، حتى يصير لون الصبغات واضحاً ومحدداً .

(٤) تحمل العينة فى لاکتوفینول ، أو صمغ لاکتوفینول وتركيبه كالتالى :

يذاب ٣٨ جم من الصمغ العربى النقى فى ٥٠ مل ماء مقطر

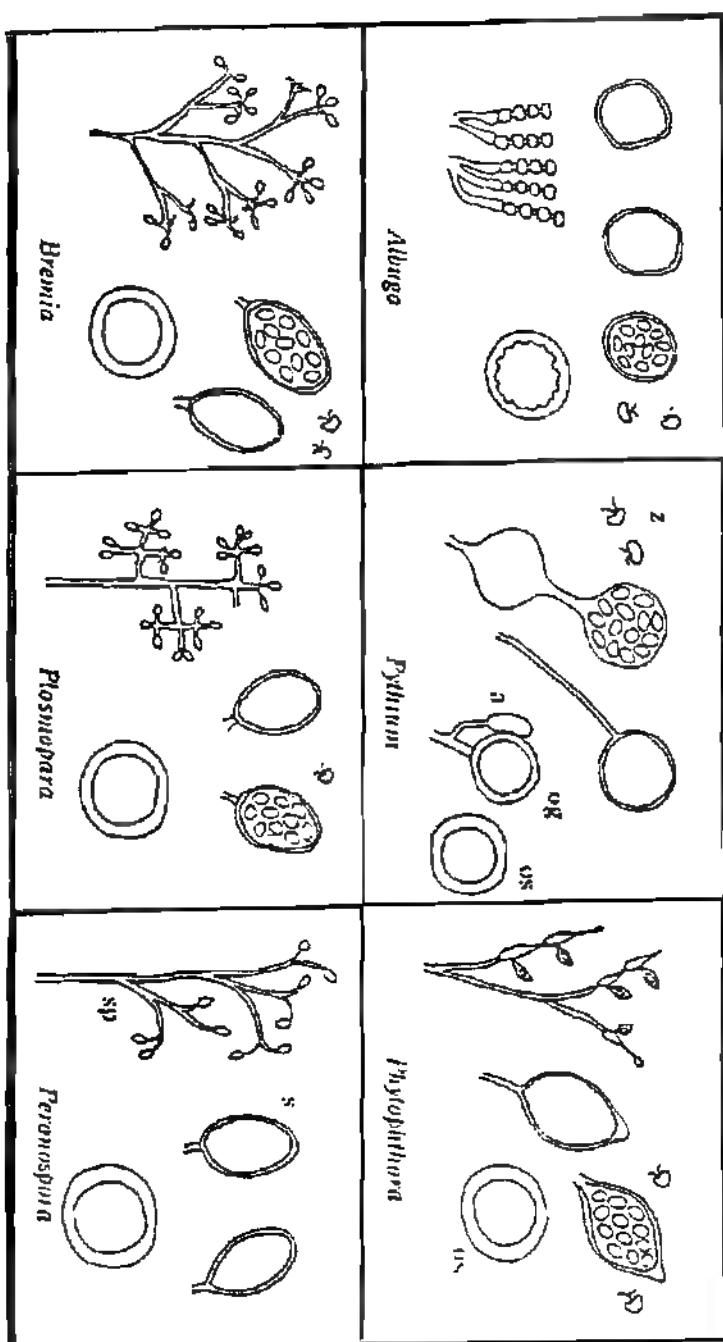
يضاف ٥ جم جلوكوز و ٦ جم لاکتوفینول

يرشح لمحلول فى موسلين

يستعمل هذا الصمغ بارداً ويجف سريعاً .

ويقترح البعض صبغ البياض الزغبى بواسطة اللاكتوفينول - النيجروسين ؛ حيث تظهر الأنسجة المصابة بجلاء فضلاً عن أنه يظهر البويات واضحة .





شکل ( ۳-۱ ) : أمثلة لبعض أجناس الفطريات البيضاء Oomycetes

يضاف ١ - ٥ مل من محلول مائي للنيجرومين إلى ١٠٠ مل لأكثوفينول . يمكن استعمال غروى الجلوسرين للتحميل بدلاً من اللاكتوفينول .

### برشمة التحضير :

عند استعمال بيئة تحميل معرضة للجفاف مثل اللاكتوفينول أو غروى الجلوسرين يلزم برشمة التحضير بوضع مادة صمغية مثل الكندا بلسم أو الأسفلت أو غيرهما حول حافة الغطاء لمنع تبخر البيئة وجفافها وبالتالي يمكن حفظ التحضير فى حالة جيدة لفترة زمنية طويلة .

من الصعوبات التى قد نواجه برشمة التحضير تسريب المادة الصمغية أسفل الغطاء مما يؤدي إلى تلف التحضير خاصة إذا كانت البيئة سائلة مثل اللاكتوفينول أو غروى الجلوسرين، وللتغلب على ذلك يراعى قبل إجراء عملية البرشمة إزالة الزائد من بيئة التحميل ووضع الشريحة فى مجفف لعدة أيام حتى يزداد سمك قوام البيئة ثم تطوق حافات الغطاء بطبقة رقيقة جداً من غروى الجلوسرين الساخن بفرشة وتترك لتماسك تماماً ثم تجرى عملية البرشمة بعد ذلك ، يعيق غروى الجلوسرين نتيجة تماسكه تسرب المادة الصمغية أسفل الغطاء ، وإذا فرض وتسرب شيء من الغروى فإنه يختلط باللاكتوفينول أو غروى الجلوسرين اختلاطاً تاماً فلا يكون له أثر يذكر .

### (١) طريقة التطويق :

يستعمل فى ذلك آلة الدوارة وفرشة صغيرة ومحلول من المادة المستعملة متوسطة القوام ، وتبغ الخطوات التالية :

(١) يزال الزائد من بيئة التحميل ، وينظف حول الغطاء جيداً ، تستعمل أغطية شرائح مستديرة .

(٢) تلمس حافة الغطاء فى ثلاث أو أربع نقاط متفرقة ليتماسك الغطاء ولا يتحرك أثناء التطويق .

(٣) تثبت الشريحة على المائدة الدوارة وتنظم ليكون الغطاء فى وضع متوسط مناسب فوق الدائرة التى تمشى مع محيطه .

(٤) تغمس الفرشة فى المحلول ، ويؤخذ بها كمية مناسبة حتى لا تسيل على الشريحة أثناء التطويق وتفسد العملية ، يرتكز باليد على اللوحة الثابتة وتدار المائدة بسرعة وأثناء

الدوران يراعى أن يلمس طرف الفرشاة حافة الغطاء من خارجه قليلاً ثم تحريكها برفق إلى الداخل حتى تغطي حافة الغطاء لمسافة ١ مم تقريباً إلى الدخول وبذلك تتكون حلقة رقيقة منتظمة حول حافة الغطاء ، تترك لتجف وتعاد الكرة مرة أو اثنتين حتى يتم وضع كمية كافية حول الحافة ولا توضع طبقة إلا بعد تمام جفاف الطبقة السابقة لها تماماً .

وفصل عمل الطوق من طبقتين رقيقتين أو ثلاث بدلاً من طبقة واحدة سميكة حتى لا تكون عرصة للتشقق فيجف التحصير ويتلف ، وإذا كان الغطاء مربعاً أو مستطيلاً فيمكن عمل التطويق باليد لكنه يكون غير منتظم فى سمكه وشكله .

ويمكن استعمال الخليط التالى فى يرشمة الأغطية :

فارلين ٥٠ % + شمع البارافين ٥٠ / (درجة انصهاره ٥٨-٦٠ م) .

وتستعمل هذه الطريقة إذا كان الهدف المحافظة على التحضيرات لفترة ليست طويلة ، ويمكن زيادة لفترة بطلائها بعد ذلك بطبقة من الكندا بلسم زيادة فى الصيانة .

من مميزات هذا الخليط أنه لا يتسرب تحت الأغطية ويتماسك بسرعة عندما يبرد ولا يجف للدرجة التى تعرضه للتشقق وفوق ذلك يمكن تنظيف الشرائح والأغطية بسهولة عند الاستغناء عن التحضيرات بوضعها فى ماء ساخن فينصهر الخليط ويطفو على لسطح وبذلك يمكن إزالته وتنظيف الشرائح والأغطية بعد ذلك بإحدى الطرق المعروفة .

#### (ب) طريقة ديهل Diehl

تستعمل هذه الطريقة فى حانة التحضيرات المطلوب حفظها لسين عديدة. وهى كالتالى:

(١) توضع نقطة من بيثة التحميل اللاكتوفيل أو غروى اجلسرين فى وسط غطاء كبير (قطره ٢٢ مم) .

(٢) توضع العينة فى البيئة وتنظم بإبرتين نظيفتين ، ثم تغطى بغطاء أصغر (قطره ١٢-١٤ مم) ، يوضع الغطاء الصغير فى موضع متوسط من الغطاء الكبير .

(٣) يزال الزبد من البيئة بورقة ترشيح ، ثم توضع كمية مناسبة من الكندا بلسم فى وسط الغطاء الصغير .

(٤) توضع الشريحة برفق على التحضير حتى تغطي الكندا بلسم العينة والغطاء الصغير وتنتشر فتملاً الجزء الخالي من الغطاء الكبير ، يستحسن أن تكون الكندا بلسم سميكة القوام نوعاً حتى لا تميل للتسرب تحت الغطاء الصغير والاختلاط بالبيئة ، تسخن الشريحة قليلاً حتى يساعد ذلك على انتشار الكندا بلسم .

(٥) تقلب الشريحة بعد ذلك ، فيكون التحضير في وضعه النهائي ، وتوجد العينة ما بين المطائين ، محفوظاً من الجفاف مبرشماً بطبقة الكندا بلسم التي انتشرت وملأت الفراغ حول الغطاء الصغير إلى حافة الغطاء الكبير .

رغم الاحتياطات قد تميل الكندا بلسم إلى التسرب تحت الغطاء ، يمكن تجنب ذلك بطلاء حافة الغطاء الصغير بطبقة رقيقة من غروى الجلوسرين ثم إضافة الكندا بلسم بعد تماسك غروى الجلوسرين .

### الصبغ المستديم :

يمكن استعمال طريقة الصبغ المزدوج ، ولا تختلف خطوات الصبغ بهذه الطرق المختلفة عما هو متبع في التكنيك النباتي العام ، كما توجد طرق خاصة لصبغ الأنسجة المصابة وإظهار الميسليوم في أنسجة العائل مثل :

### (١) بيانيز III ب :

تحضر هذه الصبغة كما يلي :

أخضر الملاكيث	٠.٥٠ جم
فوكسين حمضى	٠.١٠ جم
أصفر مارشياس	١ - ٠ جم
ماء مقطر	١٥٠ مل
كحول ٩٥ ٪	٥ مل

### خطوات الصبغ :

(١) تغسل لقطاعات بعد لقتل والتثبيت في ماء أو كحول ٥٠ ٪ .

(٢) تصبغ القطاعات في بيانيز III ب لمدة ١٥-٤٥ دقيقة .

- (٣) تغسل القطاعات في ماء أو كحول ٥٠ ٪ ثم تدرج حتى كحول ٩٥ ٪ / حامض (كحول إيثايل ٩٥ ٪ مضافاً إليه بضع نقط من حامض الأيدروكلوريك) .
- (٤) تروق القطاعات في تربيتين فينولي (٢ جزء فينول بمللورث منصهرة + ٣ أجزاء تربيتينا) .
- (٥) تغسل القطاعات في زيول وتحمّل في الكندا بلسم .
- تصبغ أنسجة العائل باللون الأخضر وميسليوم الطفيل باللون القرنفلي الغامق .

#### (ب) أحمر المجدالا - الأخضر الضوئي Megdala red-Light green

- (١) بعد القتل والتثبيت تغسل القطاعات في الماء .
- (٢) تصبغ القطاعات في محلول حديث من أحمر المجدالا ٢٥ ر ٠ ٪ في ماء الصنبور لمدة دقيقة إلى ٢٤ ساعة ، تتوقف مدة الصبغ على قابلية ميسليوم الطفيل لتشرب الصبغة ، ويمكن تقليل المدة بزيادة قوة الصبغة .
- (٣) تروال الزيادة من الصبغة بتعريض القطاعات لمدة ٥ دقائق ماء الصنبور .
- (٤) تجفف القطاعات حتى الكحول المطلق لمدة ٣٠ ثنية .
- (٥) تنقل القطاعات إلى الأخضر الضوئي قوة ٣ ر ٧ في زيت القرنفل وتفحص تحت المجهر للتأكد من تمام الصع .
- (٦) نوصع القطاعات في زيت القرنفل لمدة ٥ دقائق أو أكثر لإزالة لزائد من الأخضر الضوئي تماماً .
- (٧) تغمس القطاعات في الزيول وتحمّل في الكندا بلسم .
- تأخذ أنسجة العائل للون الأخضر وهفات الطفيل للون الأحمر .

#### ج - مخلوط السفرائين وأزرق القطن في اللاكتوفينول الكحولي :

ويستعمل لصبغ فطريات Peronosporaceae كالبيض الزغبي في العنب .

المحلول الأول : (اللاكتوفينول الكحولي)

١ حم	فينول
١ مل	حامض لاكتيك مركز

حلسرين	٢٠ مل
كحول ٩٥ ٪	٢٠ مل

### المحلول الثانى . (مخلوط الصبغة)

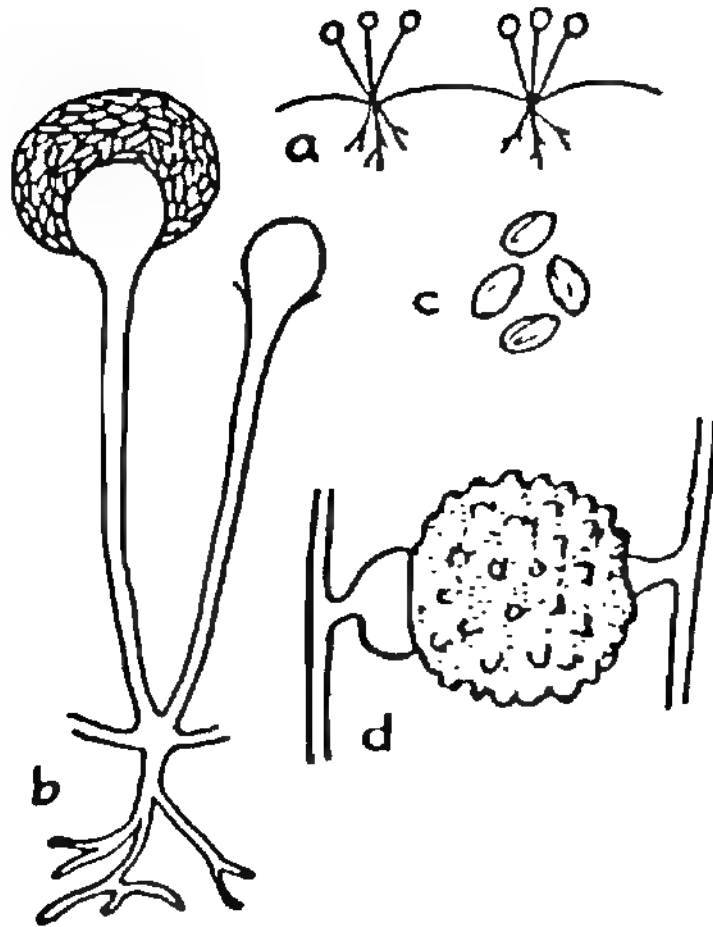
أزرق القطن	٠.٢ جم
سفرنين	٠.١ جم
لاكتوفينول كحولى (المحلول الأول)	١٠٠ مل

### قطاعات البارافين :

- (١) يزال الشمع ويجرى التدرج بالقطاعات حتى كحول ٩٥ ٪ .
- (٢) توضع فى اللاكتوفينول الكحولى (المحلول الأول) لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة .
- (٣) تصبغ فى مخلوط الصبغة (لمحلول الثانى) لمدة ساعتين أو أكثر ، وتحرك الشرائح أثناء ذلك على فترات لضمان انتشار الصبغة فى الأنسجة بيسار وانتظام .
- (٤) توضع القطاعات فى اللاكتوفينول الكحولى (المحلول الأول) حتى يزول الزائد من الصبغة وتفحص القطاعات بالمجهر لتحديد درجة الصبغ مع مراعاة أن تكون أغمق نوعاً من الدرجة المطلوبة ، ثم تغسل فى كحول مطلق .
- (٥) تصبغ القطاعات فى محلول ضعيف من السفرايين فى زيت القرنفل ٥ ٪ لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة حتى يصبح لون أنسجة العائل أحمر غامقاً .
- (٦) توضع بعد ذلك فى زيت القرنفل لتحدد الصبغة بالدرجة المطلوبة ، ويتم ذلك بالفحص المجهرى .
- (٧) تغسل فى الزيلول وتحمس فى الكندا بلسم ، مع مراعاة تمام التخلص من زيت القرنفل . يصبغ الميسليوم باللون الأزرق وأنسجة العائل باللون الأحمر .

### (٢) الفطريات الزيجية (اللاقحية) Zygomycetes

مثل فطريات *Rhizopus* (شكل ١٠-٤) و *Mucor* ويتم دراستها من التحميل الكامل للفطر وغالباً ما يستعمل لهذا الغرض اللاكتوفينول سواء الرائق أو الملون وذلك بقتل وترويق



(a) طيعة النمو (b) حوامل إسورانية

(c) > ائيم إسورانية (d) حرثومة ريشية

شكل ( ١ ٤ ) فطر الريزوس *Rhizopus* من لفطريات الريشية Zygomycetes

(جلمان Gilman ١٩٥٧)

وصبغ الهيئات إذا كانت غير ملونة ، ويستعمل فى تدوين اللاكتوفينول الصبغات التالية :  
 Cotton blue (وقد تسمى Soluble blue) أو Methyl blue أو Aniline blue .  
 كما قد يستعمل اللاكتوفينول المضاف إليه الفركسين الحمضى أو الأخضر الحمضى ،  
 وذلك بإضافة ١-٥ مل من محلول مانى للصبغة لكل ١٠٠ مل من اللاكتوفينول .  
 أما فى حالة الجراثيم الزيجية فيمكن حفظها بقطع الأجزاء المحتوية عليها من مزرعة  
 الأجار وقتلها فى محلول F.A.A. وبذلك يمكن استعمالها لدراسة الطلبة محملة فى الماء أو  
 اللاكتوفينول أو عمل شرائح مستديمة (تعمل الشرائح المستديمة بطريقة  
 Butyl Alcohol-Resin أو بطريقة Dioxan-Balsam) .

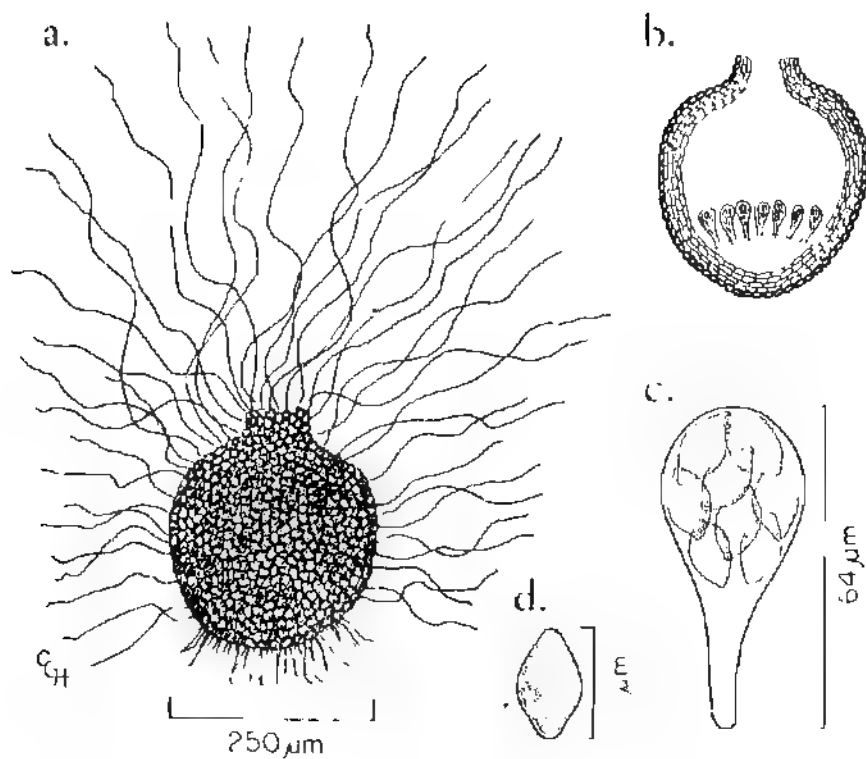
### (٣) الفطريات الاسكية (الزقية) Ascomycetes

تنمو الفطريات لمبية لأمراض العفن التابعة لهذه المجموعة مثل *Aspergil-*  
*lus* و *Penicillium* و *Chaetomium* (شكل ١٠ ٥) نمواً جيداً على البيئات الصناعية  
 وبذلك يمكن دراستها بعمل تحميل كامل فى الماء أو فى اللاكتوفينول أو فى غروى الجلوسرين  
 كما سبق الذكر مع فطر *Rhizopus* وغيره ثم تجرى برشمة للتحضيرات إذا كان مطلوباً  
 حفظها بصورة مستديمة .

أما فى حالة أمراض البياض الدقيقى *Erysipha es* فيمكن دراستها بعمل كشط أو  
 سلخ والتحميل فى اللاكتوفينول أو غروى الجلوسرين ، أما فى حالة دراسة المصتات وتفرعها  
 داخل خلايا البشرة فيمكن قتل وتثبيت الأجزاء المختارة من الأوراق فى محلول Craif  
 وصبغها بعد ذلك بواسطة Iron Hematoxylin .

أما الأكياس الناتجة من التكاثر الحسى فتقتل فى محلول Bouin أو Craif ثم تصبغ  
 باستعمال Iron Hematoxylin أو بالسفرانين أخضر سريع





- (a) منظر عام لثمرة فطرية *Perithecia*  
 (b) قطاع حلال الثمرة الأسكية القارورية ، يوضح مجموعة الأكياس الأسكية سالخنة القاعدى  
 مستخرج من القارورة  
 (c) كسر أسكى يشتمل على حراثيم أسكية  
 (d) حراثمة أسكية ، صفة

شكل ( ١ ٥ ) - فطر *Chaetomium globosum* . من لفطريات الأسكية Ascomycetes

(هدى Hanlin ١٩٩)

## ٤) الفطريات البازيدية (الهراوية) Basidiomycetes

## (١) أمراض التفحم Ustilaginales

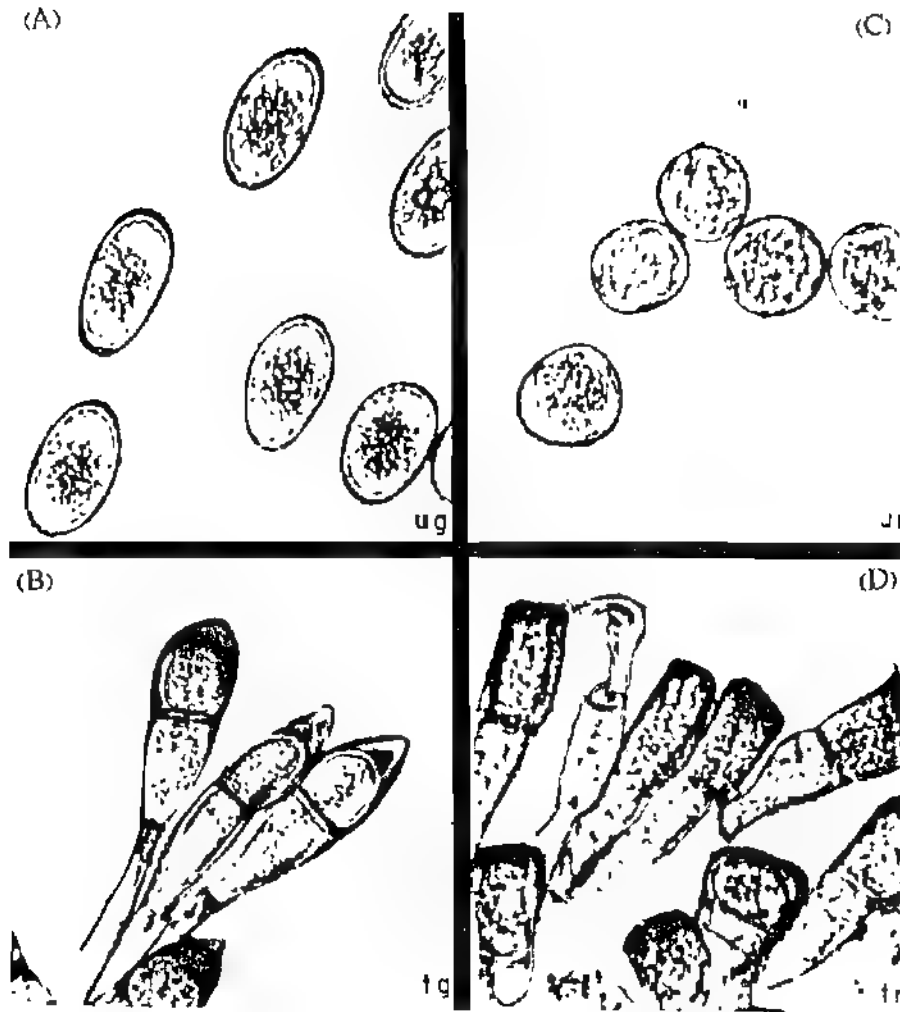
تُنتقى البثرات حديثة العمر بما حولها من أنسجة العائل وتقتل وتثبت فى محلول Craff، أما البثرات الكبيرة فيستخدم معها محلول F.A.A. .

أم الجراثيم الكلاميدية والميليوم الأول Promycelium و Sporidia فيمكن دراستها فى تحميل سائل بعد نقلها من الحقل ويمكن تحويل الشرائح من الحالة المؤقتة إلى الحالة المستديمة بالطرق سابقة الذكر .

## (ب) الأصداء Uredinales

وهى فطريات واسعة الانتشار خاصة على القمح ، تُنتقى البثرات لحديثة العمر للجراثيم اليوريديية Urediniospores والتيلينية Teliospores (شكل ١٠-٦) والأفضل أن تكون على الأوراق (وليس الساق) وتقتل فى محلول F.A.A. وتستكمل الخطوات كما سبق الذكر .

ويستعمل محلول F.A.A. أو Craff لقتل وتثبيت الطورين الأسيدى Aeciospores واليكنيدى Pycnidium ثم لصبغ باستعمال لسفرانين - أنحصر سريع ، والأفضل Iron Hematoxylin وتنع نفس الطرق مع الأصداء الأخرى .



- (A) حراثيم بوريدية .  
*Puccinia graminis f. sp. tritici* (B) حراثيم تيليتية لعطر  
 (C) حراثيم بوريدية .  
*Puccinia Striiformis* (D) حراثيم تيليتية لعطر

شكر ( ١ ٦ ) . أمثلة لبعض أجناس الفطريات الباريديّة Basidiomycetes

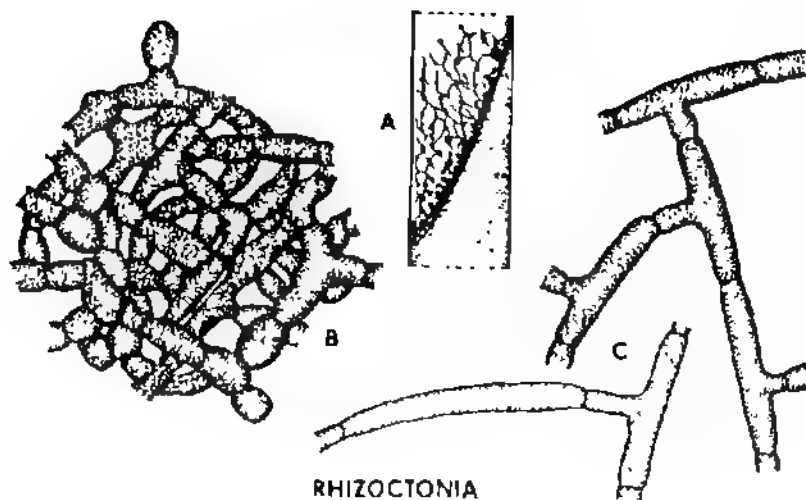
(وير Wiese ١٩٧٧)

**(٥) الفطريات الناقصة Deuteromycetes**

وتتضمن مجموعة من الفطريات لم يكتشف للآن الطور الجنسي لها وهي مجموعة من الفطريات غير متجانسة يتكون فيها الميسليوم من هيفات مقسمة مثل الجنس *Sclerotium* و *Rhizoctonia* ( شكل ١٠ - ٧ ) يستعمل لقتل وتثبيت هذه الفطريات محلول *Craf* وتصيب باستعمال *Iron Hematoxylin* ويراعى أن تكون الصبغة كثيفة ثم تخفف بمحلول حامض خفيف من حامض الأيدروكلوريك ، وفي حالة وجود الهيفات في أوعية الخشب فيفضل قتلها في محلول *F.A.A.* ، وتصيب بالطريقة التالية :

**أوراق القطن - سفرانين Cotton blue-Safranin**

- (١) تغسل القطاعات في الماء .
  - (٢) تصبغ في محلول ٠.٥٪ أزرق القطن في لاکتوفينول لمدة ٥-١٥ دقيقة مع التسخين الهين (يمكن في حالة القطاعات المنصوغة على الشريحة وضع إناء الصبغ في فرن الشمع) .
  - (٣) يزال الزائد من الصبغة بواسطة لاکتوفينول رائق .
  - (٤) تغسل في كحول ٧٠٪ لإزالة اللاكتوفينول .
  - (٥) تصبغ في سفرانين لمدة ١٠ دقائق (١٪ في كحول ٥٠٪) .
  - (٦) تغسل في كحول ٧٠٪ لإزالة الصبغة الزائدة ثم تنقل إلى كحول ٩٥٪ ثم إلى كحول مطلق .
  - (٧) ترووق في زيول وتحمّل في كندا بلسم .
- تأخذ الصبغات لوناً أزرق حاداً والأنسجة الخشبية لوناً أحمر .



(A) أحام حمرنة صغيرة وميلليوم (مررعة) .

(B) قطاع فى جسم حمرن .

(C) خلايا المسبوم

شكل ( ١٧ ) فطر ريزوكتيا *Rhizoctonia* DC

من الفصريات لدفصة Deuteromycetes

(بارت و هنتر Barnet, & Hunter ١٩٨٧)

## ١١. المجهر

### Microscope

عقب إكتشاف شلايدن Schleiden وشفن Schwann وفيرشو Virchow فى النصف الأول من القرن التاسع عشر نظرية الخلية Cell theory ، والتي مفادها أن الخلية هى الوحدة الأساسية فى تركيب الكائنات الحية بمختلف صورها شهد العالم تطوراً هائلاً فى معرفتنا عن اخلايا، ويرجع ذلك أساساً للتقدم الملموس فى صناعة البصريات وبالتالى المجهر

يعتمد الفحص التفصيلى الدقيق لتركيب الخلايا على ثلاثة أسس رئيسية :

(١) التكبير Magnification ويعتبر وسيلة لزيادة الحجم الظاهرى للشئ المراد فحصه حتى يمكن رؤيته .

(٢) التمييز (الإظهار) Resolution وهو القدرة على فصل الأشياء المتقاربة عن بعضها البعض .

(٣) الاختلاف (التقاس) Contrast ويقصد به إمكانية تحديد جزء ما عن آخر .

على الرغم أن للمجهر الضوئى قوة تكبير عالية نسبياً تصل إلى نحو ٥٠٠ ضعف احجم الطبيعى ، إلا أن قوة التمييز له محدودة ، وغير كافية لفحص بعض التراكيب الدقيقة بالخلية . ولتحقيق الاختلاف بالعينة التى تفحص مجهرياً يتم تبييتها وصبغها ، حيث تختلف قابلية أجزاء العينة للصبغات وبالتالى يمكن إكساب الأجزاء المختلفة للعينة ألواناً متباينة يسهل معها التفرقة فيما بينها .

ولقد فتح اختراع المجهر الإلكتروني أفاقاً رحبة لدراسة الخلايا ، وكما يدل لاسم يستخدم فى هذه الحالة حزمة إلكترونية بدلاً من الضوء المستخدم مع المجهر الضوئى ، تمر الإلكترونات خلال العينة ثم تسقط على لوحة فوتوغرافية وتعطى صورة للعينة يصل التكبير بالمجهر الإلكتروني إلى نحو مليون ضعف احجم الطبيعى .

يتناول الجزء التالى شرحاً مبسطاً لأساسيات الفحص المجهرى ، ثم المجهر بأنواعه المختلفة البسيط والضوئى والإلكترونى ، وكذلك فائدة وكيفية استخدام كل منها .

## اساسيات الفحص المجهرى

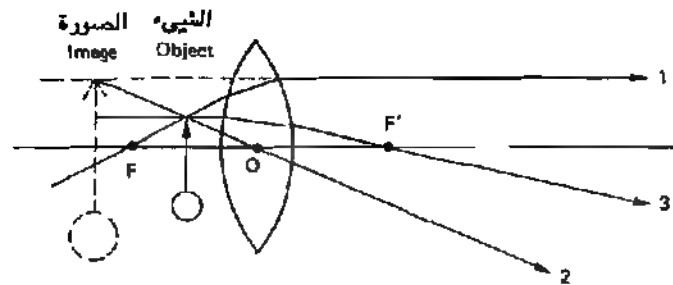
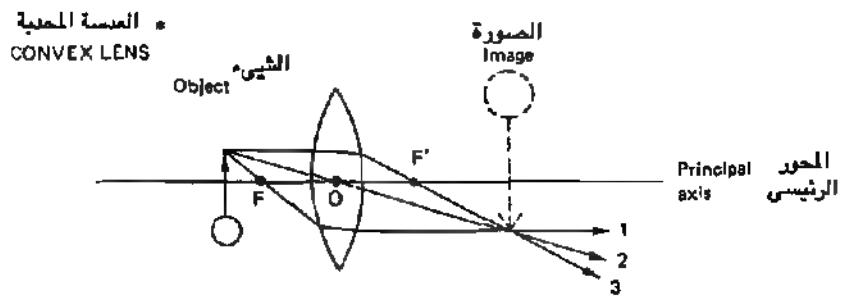
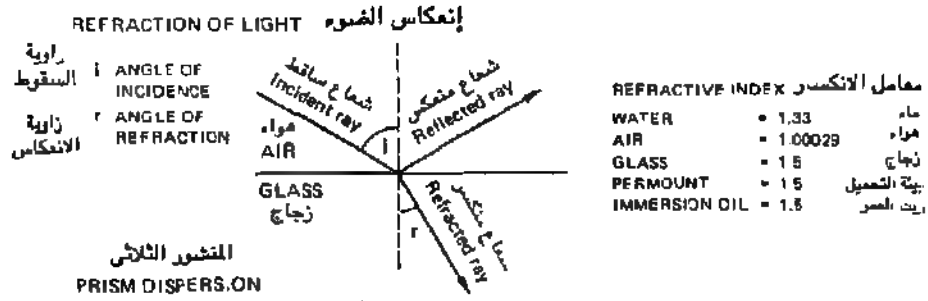
### البصريات Optics

يتركب الضوء من موجات كهرومغناطيسية Electromagnetic waves ذات أبعاد محددة تتحرك فى حط مستقيم وتتكسر على هيئة زاوية (شكل ١١-١) . تختلف سرعة الضوء تبعاً للوسط الذى يتحرك خلاله . ويعبر معامل انكسار الوسط عن نسبة سرعة الضوء فى الفراغ إلى سرعته فى وسط معين . ومعامل الانكسار للهواء ١,٠٠٢٩ بينما معامل الانكسار للزجاج (العدسات والشرائح وأغطية الشرائح) ١,٥ تقريباً ، فإذا ما انتقل شعاع ضوئى من وسط معامل انكساره منخفض (مثل الهواء ١,٠٠٢٩) إلى وسط له معامل انكسار أكبر (مثل الزجاج ١,٥) فإن سرعته تتغير مما يؤدي إلى تغير اتجاهه وبالتالي ينكسر (أو ينعكس) الشعاع الضوئى . كما هو موضح بالشكل ( ١١ - ١ ) .

يحتوى لمجهر عادة على عدسات محدبة تستفيد من خصائص انعكاس لـضوء والتي تؤدي إلى تجمع أو تشتت الأشعة الضوئية تبعاً لشكل العدسة ، وتعتمد صورة أى جسم يعترض مسار الضوء أثناء انتقاله خلال عدسة محدبة على شكل العدسة والمسافة بين الجسم والعدسة ، فإذا ما كانت المسافة بين جسم م و عدسة محدبة أكبر من مسافة البعد البؤرى (F) فإن الصورة المتكونة تكون حقيقية ، ومقلوبة ، ومكبرة ، تقع على الجانب المقابل من العدسة ، وتعتبر الصورة حقيقية Real إذ يمكن استقبالها على شاشة أو حاجز من الورق يتخلل مسار الضوء عند النقطة التى تتكون عندها صورة الجسم . أما إذا كانت المسافة بين الجسم والعدسة لمحدبة أصغر من مسافة البعد البؤرى فإن الصورة تكون تقديرية ، ومعتدلة ، ومكبرة ، تتكون على نفس الجانب من العدسة الموجود به الجسم ، ويقصد بالصورة التقديرية Virtual image تلك التى لا يمكن استقبالها على شاشة ، وهى فى واقع الأمر غير موحودة فى الفضاء لكنها صورة يكونها العقل عقب تجمع الأشعة الضوئية المشتتة بواسطة قرنية وعدسة العين . وترجع أهمية العدسة المحدبة للمجهر إلى قدرتها على تكوين الصورة على كلا جانبي العدسة وتكبيرها فى كلتا الحالتين .

### بصريات المجهر الضوئى Optics of the light microscope

يتيح حقل الضوء الساطع بالمجهر كمحصنة لأربع عدسات حيث يقوم المكثف بتجميع



\* ١ - يظهر أي شعاع مار نقطة البؤرة موازيًا للمحور الرئيسي.

٢ - لا ينحرف أي شعاع يمر بالمركز البصري للعدسة.

٣ - يمر أي شعاع موازيًا للمحور الرئيسي خلال نقطة لبؤرة.

شكل (١-١١) رسوم تخطيطية لهندسة البصريات (ويلي Willey ١٩٧١).



الضوء بإحكام على العينة فوق الشريحة، وتعطى العدسة الشيئية صورة مكبرة للعينة المراد فحصها (تتحكم جودة لعينه فى نوعية الصورة النهائية التى ترى بالمجهر) وتقوم العدسة العينية بتكبير صورة العينة شكلها النهائى الذى تنقله لعين إلى المخ كما هو موضح بالشكل (١١-٢) .

يوضع الجسم AB المطلوب فحصه وطوله  $L$  على بعد من الشيئية أكبر قليلاً من بعدها البؤرى  $f_{obj}$  فتكون له صورة حقيقية مقسوبة مكبرة  $A_1B_1$  وطولها  $L_1$ ، تقع الصورة  $A_1B_1$  على بعد من العينية أقل من بعدها لبؤرى  $f_{eye}$  فتكون لها صورة أخرى تقديرية مكبرة  $A_2B_2$  وطولها  $L_2$  عند أصغر مدى للرؤية الواضحة، وتكون الصور النهائية مقلوبة بالنسبة للجسم الاصلى، أى أن العدسة العينية فى المجهر الضوئى تقوم بعمل المجهر البسيط بالنسبة للصورة الأولى  $A_1B_1$  .

تجدر عادة البيّنات عن الخصائص البصرية على جانب العدسة الشيئية، على سبيل المثال قد يكتب ما يلى :

Plan 40 / 0.65

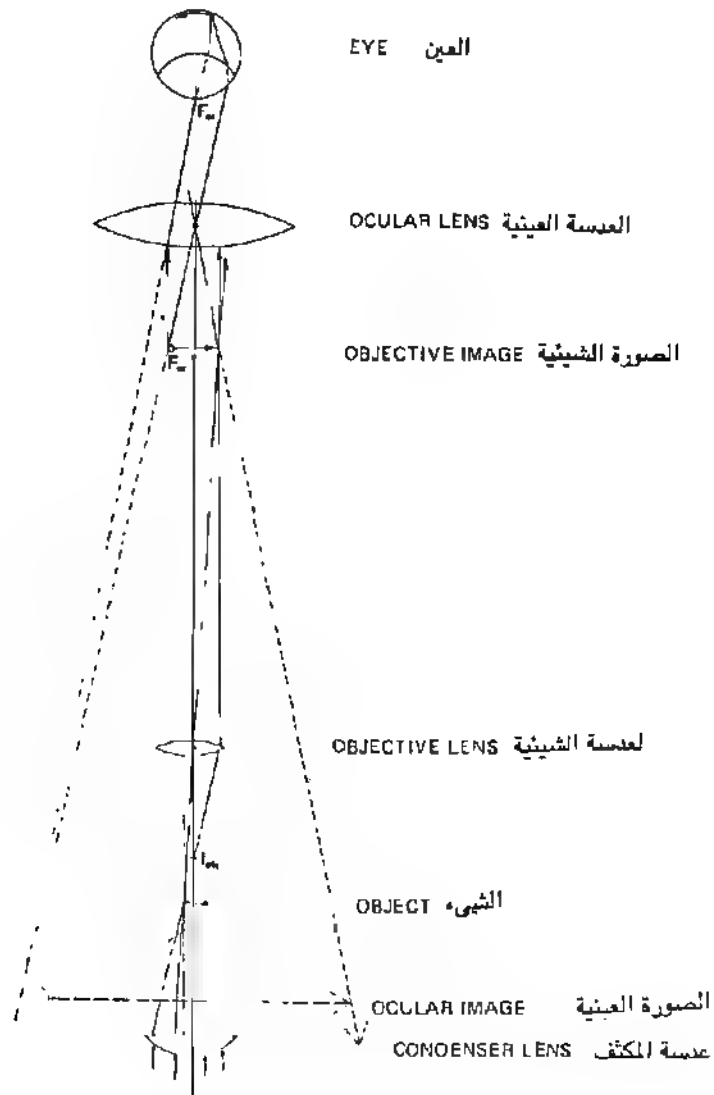
160 / 0.17

وتدل هذه الأرقام على :

المسافة العددية Numerical aperture / لتكبير الاولى Initial magnification سمك غطاء الشريحة Coverslip thickness / طول أنبوبة المجهر Tube length .

ويعنى ذلك أن هذه العدسة الشيئية من نوع Planachromat تقوم بتكبير العينة ٤٠ مرة linear magnification ومسافتها العددية ٠.٦٥ . وتصلح للمجهر الذى تبلغ طول الأنبوبة به ١٦٠ مم ومهيئة للاستخدام مع أغشية شريحة سمكها ١٧ . مم .

تتسبب أى عيوب فى تصنيع العدسة فى عدم تكوين صورة دقيقة وخلل فى قوة تكبيرها، وتوجد عدسات شيئية أخرى بها درجة من تصحيح معين لمعالجة عيوب التصنيع .



شكل (٢-١١) تكوين الصورة في المجهر الضوئي باستعمال نظام العدسة المفردة  
(ويلي Willey ١٩٧١).

## Objectives خصائص العدسات الشيئية

### (١) التكبير Magnification

تتراوح قوة تكبير العدسات لشيئية ما بين  $3.2 \times$  حتى  $100 \times$  ولا تختص بالتكبيرات الأقل من  $3.2 \times$  بالمجهر العادي بل يقتصر استخدامها على المجهر مزدوج العدسة العينية، أما التكبيرات لأعلى من  $100 \times$  فقليلة ولها استخدامات محدودة مثل  $120 \times$  والقوة الأكثر استخداماً في العدسات لشيئية هي  $10 \times$

### (٢) مسافة الشغل Working distance

هي المسافة بين عطاء الشريحة والعدسة الشيئية، وتكون هذه المسافة  $7 \text{ mm}$  في حالة  $10 \times$  و  $6 \text{ mm}$  في حالة  $43 \times$  و  $3 \text{ mm}$  في حالة  $45 \times$  و  $1.3 \text{ mm}$  في حالة  $95 \times$ . نستخلص من الأرقام المذكورة ضرورة الاحتراس عند استخدام العدسات ذات القوى الكبرى حتى لا تتعرض الشريحة للكسر لصغر المسافة بينها وبين لشيئية .

### (٣) البعد البؤري Focal length

تتضمن العدسات الشيئية ٢-٩ عدسات وكلما كثر العدد ، كان البعد البؤري للشيئية معقداً ، ويحضر عادة على لشيئية رقم معادل انزياحاً Equivalent focus فالشيئية التي لها رقم معادل للبعد البؤري (E.F) يساوي  $16 \text{ mm}$  تعطي صورة مساوية في الحجم للصورة التي تعطيها عدسة بسيطة بعدد البؤري  $16 \text{ mm}$  وكلما كبر التكبير ، صغر البعد البؤري ويراعى عدم الخلط بين العدد الدال على البعد البؤري ورقم مسافة الشغل الدال على مسافة بين الشيئية والعطاء

كما سبق إذا ذكر أن قوة الشيئية  $4 \text{ mm}$  فهذا يعني أن قوة تكبيرها  $40 \times$  تقريباً، وعلى وجه التحديد  $43 \times$  فقد درجت لمصانع قديماً على أن تكتب رقم التكبير مقرباً، وحالياً يكتب الرقم لصحيح الدال على قوة التكبير حتى يسهل على الباحث حساب مقدار التكبير النهائي للعيمة ( قوة تكبير الشيئية  $\times$  قوة تكبير العينية ) كانت قوة التكبير تكتب قديماً 16-8-4-2mm أما الآن فتكتب  $3 \times 5 - 10 - 20 - 40 - 60 - 70 - 90 - 95$  120- .00

#### ٤. عمق الرؤيا Depth of focus

لكل قطاع فى عينة نباتية مهما كان رقيقاً سمكاً محدداً وعند استعمال الشيتية لصغرى 10 X نجد أنه عند ضبط الرؤيا على الحافة العلوية لجدار خلية ما تظهر غالباً الحافة السفلية من قاعدة الجدار، أما إذا استعملت شيتية قوة 45 X وضطت الرؤيا على الحافة السفلية للخلية فإن جدارها العلوى لا يرى .

يعرف هذا الامتداد الرأسى لمنطقة الرؤيا، الوضحة بعمق الرؤيا Depth of focus وهي تقل كلما كبرت قوة تكبير الشيتية ولو أن قوة التكبير ليست هى العامل الوحيد لذلك .

#### ٥. قوة التمييز Resolving power

وهى خاصية معينة فى العدسة يمكن بها التمييز بين الأجسام بحيث تظهر مستقلة مهما كانت المسافة بينها متناهية فى الصغر كما هو الحال مع Chromomeres على الكروموسومات Chromosomes ولو فرضنا أن هناك نجمين متجاورين فإن زاوية الرؤيا تصغر كلما بعد الإنسان عنها، فإذا نظر إليهما شخص ضعيف فى قدرة التمييز فإنه يراهما كنجم واحد ، بينما إذا نظر إليهما شخص آخر لديه قوة تمييز عالية فإنه يراهما اثنين لاواحدًا، فإذا قارنا ذلك بما يحدث بالمجهر فإن العدسة الضعيفة تظهر الكروموسوم الرفيع كخيوط واحد، بينما تظهر العدسات ذات القوى الكبيرة والتمييز الجيد أن الكروموسوم خيطان مستقان على بعضهما Chromatids وذلك إذا فحص الكروموسوم أثناء عملية الانقسام .

وعلى ذلك ليس المهم أن يرى الشخص الأجزاء الصغيرة، ولكن الأهم من ذلك أصغر مسافة بين شيتين يمكن للعدسة أن تميز بينهما وتظهر كل منهما مستقلاً عن الآخر .

يعبر عن هذه القوة بمصطلح المسافة العددية (N.A.) Numerical aperture وهو العدد الدال على قوة التمييز، وكثيراً ما يكتب هذا العدد على الشيتات، وهو صغير إذا كانت العدسة صغيرة القوة (0.25 إذا كانت قوة العدسة 10 X) ويكبر كلما كبرت قوة تكبير العدسة فيصل إلى 1.4 للعدسة التى قوتها 90 X وأعلى رقم فى العدسات الجافة هو 0.95 حيث توجد مسافة هوائية بين العدسة والغطاء أما فى العدسات الزيتية فيرتفع الرقم إلى 1.4 .

## (٦) التوافق Synchronization or Parfocalization

يقصد به أنه إذا ضبطت الرؤية بواسطة العدسة الصغرى 10 X فإنه عند استعمال الشيئية المتوسطة أو الكبرى عندما تأخذ مكانها يجب أن تشهد الصورة واضحة بمجرد التغيير، وعند ذلك يسهل ضبط معالم الصورة باستعمال الضابط الدقيق، أما إذا لم تشاهد الصورة واضحة وكاست الشيئيات غير مجهزة بالدقة المطلوبة وتحتاج إلى استخدام الضابط التقريبي فإن ذلك يعرض العدسات للتلف خاصة للمبتدئ نتيجة لكثرة خدش أو تكسر الشرائح .

## (٧) أنواع الشيئيات Objectives

توجد أنواع مختلفة من الشيئيات مثل :

(أ) Achromatic وهي أرخص أنواع الشيئيات ثمنًا وتستعمل في الأعمال الروتينية كالتدريس، ومن خصائصها تصحيح أخطاء انجاء لونين من ألوان الطيف الناشئ عن تحليل الضوء المخترق لحواف التحضير أثناء فحصه . وكذلك لون من الألوان التي تحترق مركز التحضير .

(ب) Apochromatic وهي تصحح أخطاء ثلاثة ألوان حافية Chromatic aberrations وكذلك لونين مركزين Spherical correction وبذلك تظهر الصورة واضحة لامعة بألوانها الحقيقية ودون تغيير في شكلها . وتعطى نتائج ممتازة في التصوير الفوتوغرافي. لكل هذه المميزات فهي غالية الثمن نتيجة لتركيبها المعقد وقلة العدسات من النوع Fluorite .

(ج) Fluorite وتسمى كذلك نسبة إلى معدن الفلوريت الذي يستعمل ملتصقًا مع نوع خاص من زجاج البصريات، وهذه العدسات من خصائصها أنها ذات قدره على تصحيح الألوان تفرق النوع Achromatic لذلك تفضل في التصوير الفوتوغرافي ولا يوجد منها سوى القوى التي تزيد عن 40 X

## خصائص العدسات العينية Oculars (Eyepieces)

يلزم لمن يستعمل المجهر الإلمام بخصائص العينيات حتى يستعمل منها ما يلزم

الأغراض المختلفة للمحصر، ويختار من العينات ما يوافق الشبثيات المختلفة، لكل عدسة عينية بعد بؤرى خاص، ولكن المتبع حالياً هو كتابة قوة التكبير عليها والسى تتراوح ما بين  $4-30 \times$ .

يمكن حسب قوة العينية التى يلزم استعمالها مع شبثة معلومة القوة، وتعرف المسافة العددية لها N.A. من المعادلة التالية .

$$N.A. \times 1000 \text{ (للشبكة)}$$

قوة تكبير لشبكة

فإذا فرض أن شبثة قوة تكبيرها  $43 \times$  و N.A. ٠,٦٥ تكون قوة العينية الواجب استعمالها هو .

$$= \frac{0,65 \times 1000}{43} \text{ تقريباً } 15$$

وعلى ذلك فإن استعمال الشبكة قوة  $43 \times$  واستعمال عينية أعنى من  $15 \times$  يصبح عديم القيمة إذ تطلب الأمر زيادة قدرة التمييز Resolving power لأنها وصلت إلى حدها لأقصى، ولكنها تفيد فى العد أو الرسم .

ويفيد استعمال المعادلة لسابقة عند شراء لعدسات لعمل التوافق اللازمة بين قوى العينات والشبثات المطلوب شراؤها .

وتوجد أنواع عديدة للعينيات أهمها ما يلى :

(١) Huygenian :

وتركيب من عدستين، وهى معدة للاستعمال مع شبثيات من نوع Achromatic وتعطى صوراً ضعيفة مع الشبثيات من النوع Apochromatic .

(ب) Compensating :

وهى معدة بحيث تعوض أى نقص فى تركيب لشبثيات من النوع Apochromatic

ولذلك تستعمل كل منهما مع الأخرى بحيث تكون من نفس الماركة ، كما يمكن استعمالها مع شيتات من النوع Achromatic أو Fluorite أعلى من قوة 40 X .

وتوجد أنواع أخرى أقل أهمية مثل النوع Flat field ومنها صنفين تجارين : Hyperplane و Planesopic ويؤخذ على هذا النوع أن العين يجب أن تظل في وضع ثابت لا تتحول عنه لأن أى حركة من الرأس تصيب جزءاً من حقل المجهر (جزءاً من الصورة)، كما أن العين تجهد إذا استعملت لمدة طويلة .

ويوجد أيضاً النوع Wide field الذى يعطى حقلاً متعاً ولكن لهذا النوع نفس مشاكل النوع Flat field .

### الإضاءة Illumination

تستعمل لمبة كمصدر للإضاءة وهى ذات وجه مسطح وآخر مقعر، كما يوجد فى المجهر المستخدم فى البحوث مكثف Condenser ويتركب من عدستين أو أكثر . وأنسب الأنواع ذلك الذى يتركب من عدستين مثل لنوع Abbe وهذا المكثف غير مهيئ لتصحيح الأخطاء الناتجة عن تحييل الضوء (الألوان) أو ليل Curvature الذى قد يوجد فى حقل المجهر، لذلك يستعمل فى الأعمال الروتينية مثل دراسة الطلقة أو البحوث الأولية، وقمة N.A. لهذا المكثف 1.25 أو 1.20 والعنسة العليا منه يمكن حلها والاكتفاء بالعنسة السفلية وبالتالى تصوير N.A. له 0.30 وتستعمل فى هذه الحالة مع لقوة 10 X (N.A. لها ٠,٥ أو أقل) فى المكثف Leitz تحمل لعنسة العلوية عن حامل مفرد وبذلك يمكن تحريكها جانباً حتى يمكن استعمال العنسة السفلية بمفردها إن تطلب الأمر ذلك، وبالتالى يمكن ملء حقل العدسات لضعيفة بالضوء

فى المكثف Abbe ذى الثلاث عدسات تكون لمسافة العددية N.A. 1.4 ويستعمل مع لشيتات التى N.A لها 1.25 ويعد هذا لمكثف أحياناً بحيث يمكن تحريك وإعادة العنسة أو اللانتين العلويتين ، وبذلك تصوير N.A. 0.70 أو 0.40 بإبعاد عدسة فى الحالة الأولى والثنتين فى الحالة الثانية

توجد أنواع أخرى من المكثفات أكثر دقة ومعدة بحيث تصحح أخطاء الألوان أو الميل فى حقل المجهر نتيجة انقصر فى التركيب ولذلك تظهر الصورة على هيئة المبة، أهمها

النوع Aplanatic والنوع Achromatic ويتركب من ثلاث عدسات منفصلة تتراوح N.A. لها م بين ٠,٢٠ إلى ١,٣ أو ١,٤ .

أعلى درجة للمسافة لعددية N.A. يمكن الحصول عليها بمكثف وشيئية يفصلهما عن الشريحة فراغ هوائي نسوى ١٠٥ ، لذلك إذ استعملت شيئية N.A. لها ١,٣٠ فإنه يجب استعمال زيت السيدر ليصل بين الشريحة والشيئية وكذلك بين المكثف والشريحة ليتمكن الحصول على الحد الأقصى لقوة التمييز Resolving power .

أحياناً بدلاً من أن تخترق الأشعة القطاع من أسفل تسلط الأشعة الضوئية على حواف العينة وبذلك تصل الإضاءة إلى العين بواسطة الانعكاس من سطح العينة ، وتعرف هذه الإضاءة باسم Dark field illumination وبذلك يظهر العينة كأن الإضاءة صادرة منها في وسط أسود ، وأبسط وسيلة لذلك استخدام قرص معدني على شكل عجلة يوضع تحت المكثف ويحجب وسطه وسط احزمة الضوئية المنعكسة من المرآة والمتجهة إلى إضاءة العينة مخترقة المكثف ، وبذلك نضاء العينة من الأشعة الحادية المائلة للحزمة الضوئية المنعكسة من مرآة

توجد مكثفات معدة خصيصاً لهذا الغرض، وتستعمل هذه الطريقة من إضاءة في دراسة الطحالب البسيطة والفطريات، كما تستعمل في فحص القطاعات غير المصبوغة ويمكن رؤية حركة لسيترولازم في أوراق الإلوديا ونوايات الإسبيروثيرا بوضوح تام بهذه الطريقة .

### التكبير Magnification

يشر عادة لقوة التكبير على لرسم بوضع خط أسفله يعبر عن مقياس الرسم Scale line ويتم تحديد مقياس الرسم بقياس العينة بالعينية ميكرومترية Ocular micrometer أو المائدة المتحركة ذات لورنية Mechanical stage vernier ، وهي مقياس صغير منزلق على أداة مدرجة ، وأقل قياس يقدره هو ٠,١ مم .

ولا شك أن تقدير قوة التكبير من خلال خط يعبر عن مقياس الرسم أدق بكثير من حساب التكبير من المعادله التقليدية التالية

$$\text{قوة التكبير} = \text{قوة تكبير العينة} \times \text{قوة تكبير الشيئية}$$



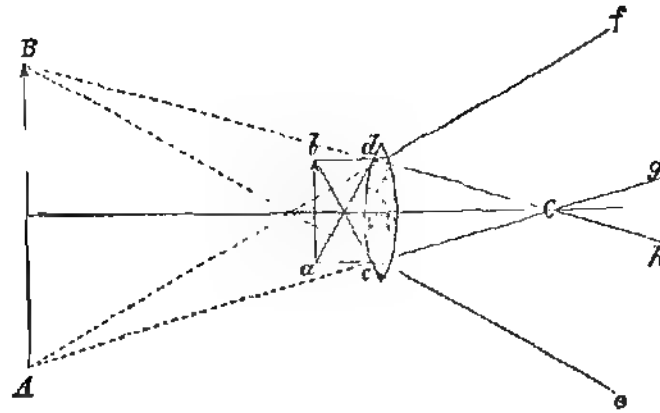
## أنواع المجاهر

### Microscope types

كثيراً من الكائنات الحية من لدقة بحيث يصعب مشاهدتها بالعين المجردة ، كما أن كثيراً من مكونات الكائن الحي يستحيل رؤيتها بالعين المجردة، من هنا نشأت الحاجة إلى البحث عن وسيلة لتكبير حتى يمكن رؤية ودراسة الكائنات الحية ومكوناتها بدقة - وهذه الوسيلة هي المجهر (الميكروسكوب) .

### اولاً : المجهر البسيط Simple microscope

١٢. وضع شيئاً ما بين عدسة محدبة البؤرتين وبؤرتها تكون له صورة مكبرة في موضع بعيداً عن العدسة خلف هذا الشيء، في الشكل (١١ - ٣) عدسة محدبة البؤرتين، و  $ab$  الشيء، و  $ac$  و  $bd$  شعاعان موازيان للمحور البصري، تنكسر الأشعة بواسطة العدسة وتتجمع في نقطة البؤرة  $c$  وتحرف بعد ذلك إلى  $g$  و  $h$  حيث تلتقي بشبكة العين، وتنكسر الأشعة  $ad$  و  $bc$  جهة  $f$  و  $e$  ثم تلتقي في الأخرى بشبكة العين، تشاهد العين الصورة المكبرة  $AB$  حيث تكون الخطوط كامتداد للأشعة المنكسرة  $(fA - gA)$  و  $(eB - hB)$  .



Formation of Image by a Simple Lens

شكل (١١-٣) . كيفية تكون الصورة المكبرة في المجهر البسيط

(هناوسيك Hanausek ١٩٠٧)

تُعرف العدسة، أو مجموعة العدسات، التي تعطي هذا التكبير بالمجهر البسيط، وتوضع العدسات عادة في حامل معدني، أو مطاط قوي، وترتب بطريقة تسمح باستخدام أكثر من عدسة معاً، قد ترتب العدسات على محور متحرك داخل غطاء، وتفتح عند الاستخدام على شكل عدسة جيب Pocket lens (شكل ١١-٤).



شكل (١١-٤) عدسة جيب  
(هانوسيك)

Hanausek

(١٩٠٧).

ويعتبر مجهر الفحص الدقيق Dissecting

microscope (شكل ١١-٥) من أكثر الأشكال

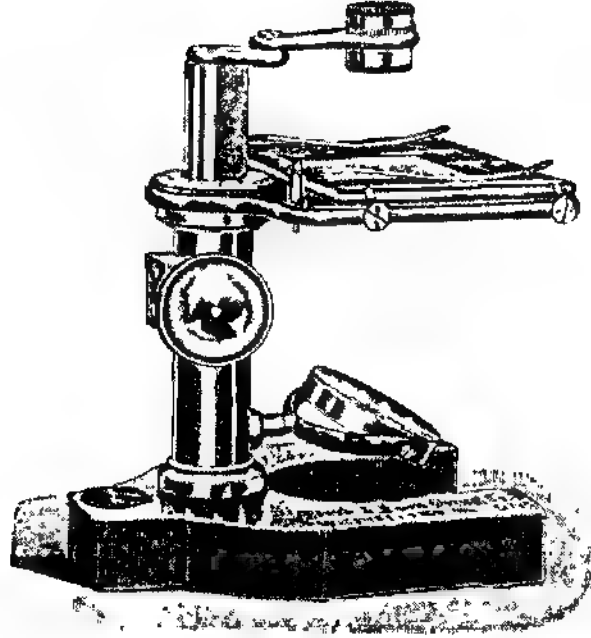
المتداولة والمقبولة حيث تحمل العدسة على ذراع

يتحرك رأسياً على ترس للحصول على صورة دقيقة

بينما يوضع الشيء المطلوب فحصه على لوحة

زجاجية على مائدة وقد يزود بمراة لتعكس الضوء

على الشيء المطلوب فحصه.



شكل (١١-٥) مجهر الفحص الدقيق Dissecting microscope

(هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).

## ثانياً : المجهر المركب (الضوئي) Compound microscope

المجهر المركب (أو المجهر الضوئي Light microscope) من أهم الأجهزة المعملية التي تتطلبها دراسة العلوم لبيولوجية، وتتخصص الطريقة التي يعمل بها المجهر الضوئي في تخلل العينة المطلوب فحصها بحزمة من الضوء ثم مرور هذه الحزمة في نظام من العدسات الكبيرة تعمل على تكبير وإيضاح أبعاد العينة المراد دراستها.

### تركيب المجهر الضوئي

يتكون المجهر لضوئي (شكل ١١-٦) من الأجزاء التالية، ويجدر الإشارة إلى أن هناك عدداً من الأشكال التي يوجد عليها المجهر، ويرجع ذلك إلى التطور المستمر في صناعة المجهر، وسالتلى قد توجد بعض أجزاء المجهر التالية أو قد يوجد بديل آخر لها أكثر تطوراً

(١) أنبوبة المجهر Body tube : وهي الجزء الرئيسى بالمجهر، يبلغ طولها ١٦ سم، ذات شكل أسطواني تحمل في طرفها العلوى العدسة العينية Ocular lens وهي واحدة، أو قد تكون ثنتين، ويوجد في الطرف السفلى لأنبوبة المجهر القطعة الأنفية Nose piece تحمل ١-٤ عدسات شichtige Objective lenses مختلفة القوى، ويوجد ترس على جانب الأنبوبة يساعدها على الحركة رأسياً .

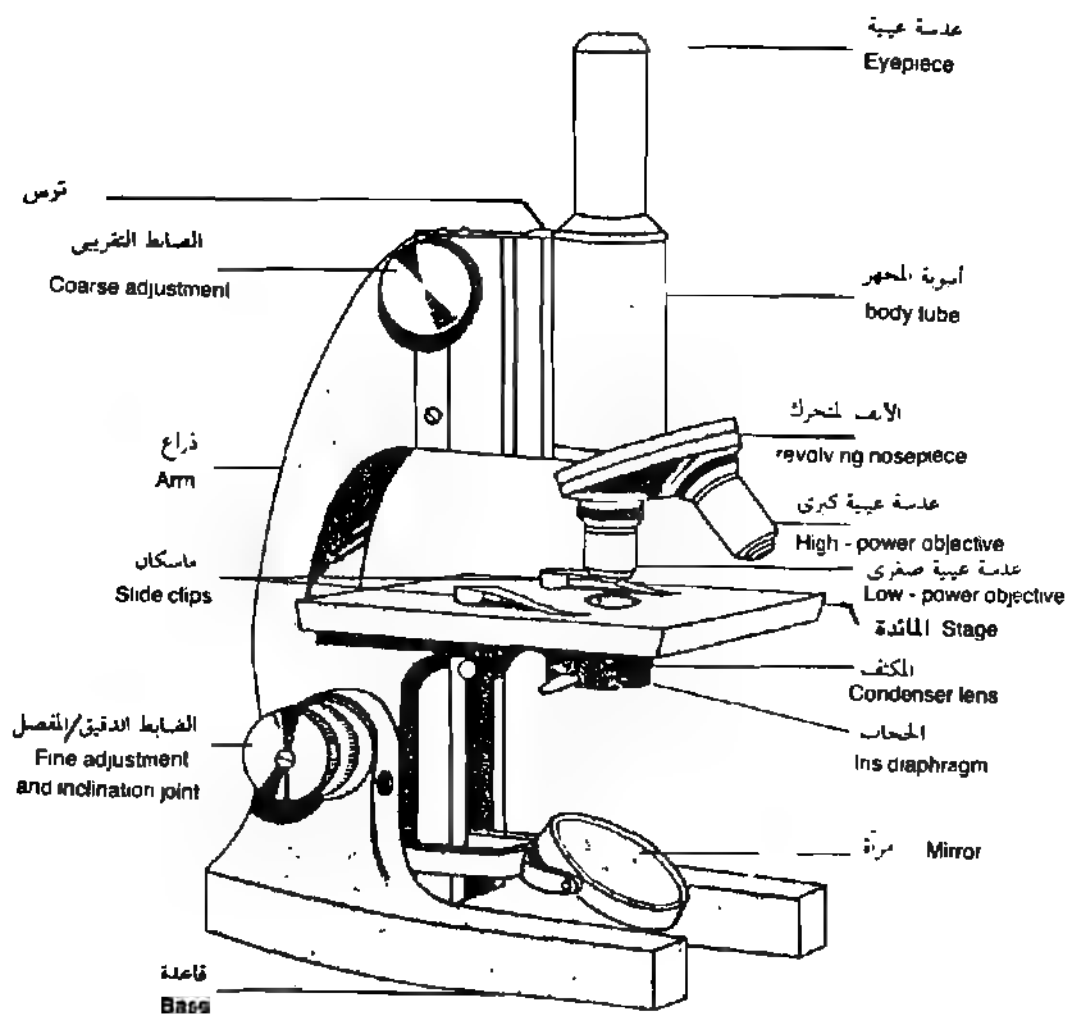
(٢) الذراع Arm : وهي الجزء الذى يحمل منه المجهر عند التدول .

(٣) القوائم Standard : جزء أسطواني يقع بين المائدة والقدم .

(٤) المفصل Joint : يستخدم في إمالة المجهر لتيسير استعماله ويقع بين القوائم والذراع .

(٥) لقدم Foot ويمثل قاعدة ارتكاز المجهر (لذلك يصنع من معدن ثقيل الوزن)، ويكون على شكل حدوة الحصان أو حرف Y .

(٦) المائدة Stage : جزء مستو على هيئة رف، قد تكون مربعة أو مستديرة حيث توضع الشريحة وعليها العينة المطلوب فحصها، ويوجد في منتصف المائدة ثقب مستدير يسمح بمرور حزمة الضوء خلال العينة المطلوب فحصها، وللمائدة مزودة بماسكين Clips صميرين للتحكم في وضع الشريحة عند الرغبة في إمالة المجهر، وقد يوجد ماسك واحد كبير متحرك .



شكل (١١-٦) : المجهر الصوتي (باعثن والغزاوي ١٩٨٥).

(٧) ضبط تقريبي Coarse adjustment : ويستخدم فى تحريك أنبوبة المجهر رأسياً بأبعاد ملموسة للحصول على صورة للعينة المطلوب فحصها، ويستخدم عادة مع العدسات الشبكية ذات القوة الصغيرة .

(٨) ضابط دقيق Fine adjustment : ويساعد فى تحريك أنبوبة المجهر رأسياً لمسافات صغيرة جداً، ويستخدم مع العدسات الشبكية ذات القوة الكبيرة للحصول على صورة للعينة دقيقة واضحة .

(٩) المرآة Mirror : ذات سطحين أحدهما مستوى والآخر مقعر لجمع وتوجيه الأشعة الضوئية خلال العينة أثناء فحصها، وقد يكون الضوء طبيعياً باستعمال ضوء الشمس غير المباشر أو صناعياً بواسطة لمبة كهربائية، ويستغنى عن المرآة فى حالة وجود لمبة كهربائية مثبتة أسفل مائدة المجهر وهو الأكثر شيوعاً .

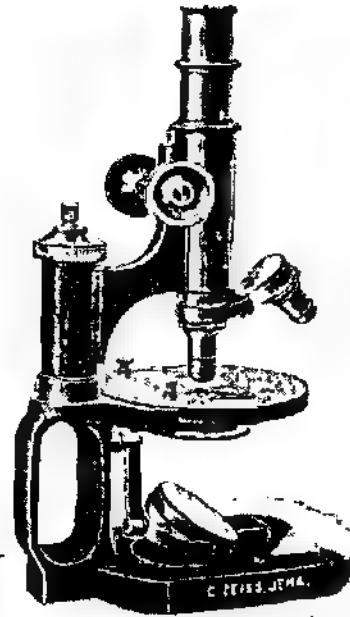
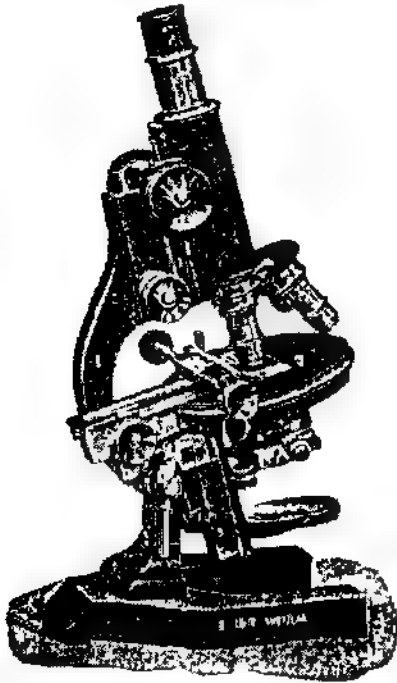
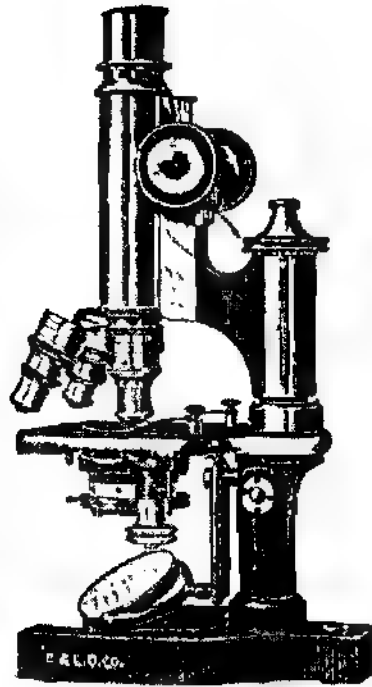
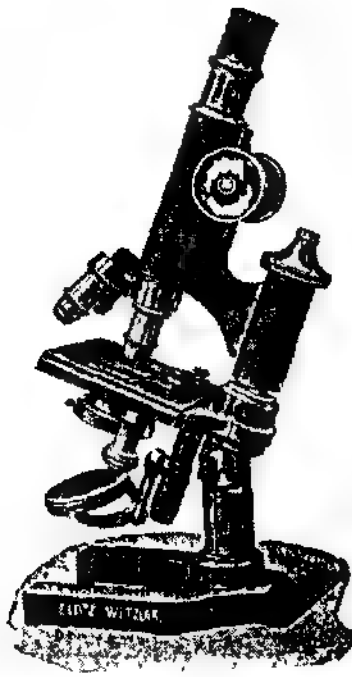
(١٠) المكثف Condenser : جهاز مثبت أسفل المائدة يقوم بتجميع الأشعة الضوئية التى تتخلل العينة وتكثفها للحصول على أفضل إضاءة للفحص ؛ خاصة عند استخدام القوى الكبرى .

(١١) الحجاب Diaphragm : يثبت أسفل المكثف للمساعدة فى الحصول على أفضل الظروف الضوئية للفحص .

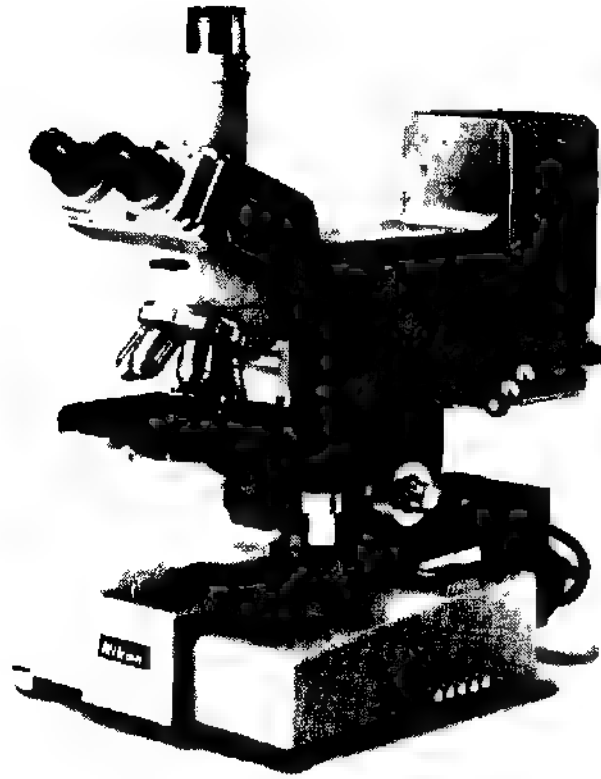
توضح النماذج (شكل ١١-٧ و ١١-٨) طرزاً مختلفة للمجهر فى بدايات صناعته وكذلك الطرز الحديثة منه حيث تطورت إمكانيات الفحص به بصورة مذهلة ، وتعددت أشكاله وتقدمت قدراته مما ساعد على قطع أشواط بعيدة فى تعرف التركيب التشريعى للأعضاء المختلفة للنبات وكذلك تسجيل ما يتم فحصه بكاميرات التصوير المجهرى المتقدمة الصنع .

## استعمال المجهر الضوئى

- (١) تعامل مع المجهر بعناية ورقة واحذر القوة والعنف عند استخدامه .
- (٢) تأكد من نظافة العدسات العينية والشبكية وكذلك المرآة ولا تلمسها بأصابعك بطريقة خاطئة حتى لا تترك عليها أية آثار تعيق الرؤية الواضحة



شكل (١١-٧) : بعض طرز المجهر في بدايات صناعته توصح الشكل الذي كانت عليه الموديلات المختلفة التي سادت كذاك (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).



شكل (٨-١١) : أحد الطرز الحديثة للمجهر توضح تطور تقنية صناعته والكاميرا  
الملحقة به للتصوير المجهري.

- (٣) يمكن إزالة قطرات الماء أو البصمات من على العدسات أو المرآة باستخدام قطعة من قماش نظيفة أو الورق الخاص بالتنظيف
- (٤) يراعى أن تكون الإضاءة على أكمل وجه أثناء فحص العينة، سواء كان مصدر الضوء مستقلاً أو مشبهاً بالمجهر - ويساعد المكثف والحجاب في تنظيم الإضاءة حتى تكون الصورة تامة الوضوح .
- (٥) عند فحص شريحة مجهرية، تستخدم القوة الشبكية لصعري (أقر من 10 X) أولاً وتوسط الصورة في هذه الحالة بواسطة الصبب التقرى، وإن تطلب الأمر تستخدم بعد ذلك لقوة لشبكية لكبرى (أكر من 10 X) مع استخدام الضابط لضبط وفي هذه الحالة تأكد من وضع غطاء الشريحة فوق عينة المحصورة في المعمل .
- (٦) احذر حفاف التحصير أثناء الفحص .
- (٧) تأكد من فتح عينيك جيداً خلال الرؤية في العدستين لعينيتين أثناء الفحص
- (٨) بعد تمام الفحص نرفع الأنبوبة بعيداً عن المائدة ، ثم نصح الشريحة وننظف المجهر جيداً .

### ملحقات المجهر Microscopic accessories

يزود المجهر عادة بمجموعة من إضافات اختيارية لتعظيم قدر الاستفادة منه، من هذه الإضافات ما يلي :

#### (١) الميكروميتر Micrometer

يستخدم الميكروميتر لقياس أبعاد معينة في عينة مجهرية ، ويتكون من قطعتين :

##### (i) القطعة العينية للميكروميتر Eyepiece micrometer

تركب من تدريج محمل على قطعة عينة، يمكن عند وضعها برفقة العدسة العينية مشاهدة أقسام هذا التدريج، كما يمكن في أحوال مضاهاة أي عينة مجهرية أو جزء منها بهذا التدريج، ولما كان ما يشاهد خلال المجهر لا يمثل الحجم الطبيعي للعينة ، وإنما العينة مكبرة من خلال العدستين الشبكية ثم لعينية ، فإن القراءة المباشرة للقطعة العينية للميكروميتر



لا تعطى الأبعاد الحقيقية للعينة التي يحرق قياسها، لذلك لابد من تحديد عامل ثابت لكل عدسة شبيثة من عدسات المجهر، ولإجراء ذلك تتم معايرة باستخدام قطعة أخرى هي الشريحة الميكرومترية Stage micrometer .

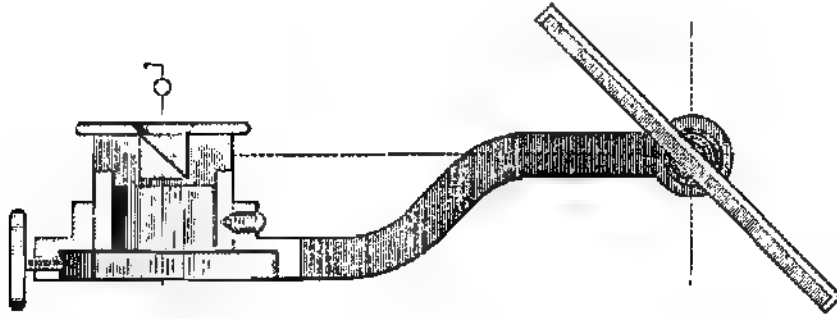
#### (ب) الشريحة الميكرومترية Stage micrometer

تجرى معايرة Calibration القطعة العينية للميكرومتر باستخدام شريحة ميكرومترية ذات مقياس مدرج طوله عادة ١ مم مقسم إلى ١٠٠ قسم (القسم = ١٠ ميكرون) ومن خلال الفحص المجهرى يقدر عدد الأقسام بالقطعة العينية للميكرومتر ، التى تقابل عدداً محدداً من أقسام الشريحة الميكرومترية ، وبالتالي يتم تحديد القياس الحقيقى لكل قسم بالقطعة العينية، وتكرر العملية مع كل عدسة شبيثة عند استخدامها، وبذلك يمكن حساب أبعاد أى جزء بالعينة تحت الدراسة ، من خلال تقدير عدد الأقسام المساوية لها بالقطعة العينية، وحساب الأبعاد الفعلية المطلوب تحديدها .

#### (٢) كاميرا لوسيدا Camera lucida

كاميرا لوسيدا جهاز على درجة كبيرة من الأهمية يساعد فى رسم العينة المجهرية، حيث يجرى بطريقة معينة نقل صورة العينة المجهرية إلى ورق الرسم، وفى حالات أخرى تعكس صورة من القلم لتظهر فوق الصورة التى تشاهد خلال المجهر .

يجرى تثبيت حلقة الجهاز (شكل ١١-٩) بالطرف العلوى لأنبوبة المجهر بواسطة مقبض يرمى إلى اليسار ومساعدة مسارين قلاووظ، يشتمل المكعب الزجاجى على منشورين ملتحمين معاً، يطلّى السطحان الفطريان الملتحمان معاً بالفضة فيما عدا موضع صغير بالمنتصف، وتوجد مرآة تتحرك مفصلياً على ذراع بحيث تبعد النقطة الوسطية للمرآة أفقياً عن منتصف المجهر بمسافة ٧ مم، يضبط المكعب الزجاجى بحيث تمر الصورة التى تظهر من خلال العدسة العينية دون أى عوائق خلال الموضع الصغير المجهر خلال السطح الفضى بحيث ترى بالعين فى الوقت الذى تنعكس صورة فلم الرسم بواسطة المرآة من خلال ثقب فى إطار نحاسى يحيط بالسطح الفضى ، والسى تنعكس بدورها وترى بالعين، تتحرك المرآة بصورة تسمح بنقل الرسم فى الموضع المطلوب على الورقة، ويزود الجهاز بقطعتين من الزجاج المدخن المتحرك توضعان بين المرآة والمكعب الزجاجى للتحكم فى كمية الإضاءة اللازمة لوصوح الصورة .



Abbé Camera Lucida. (Zeiss.)

شكل (١١-٩) . رسم تخطيطي للكاميرا لوسيدا (هانوسيك Hanausek ١٩٠٧).

بالإضافة إلى ما سبق قد يزود المجهر بمكثف Condenser حجاب Diaphragm  
جهاز ضوء مستقطب Polarization apparatus - مائدة متحركة Mechanical stage  
آلة تصوير Camera - شاشة عرض Monitor - عدسة عينية إضافية تمكن شخصان من  
المشاهدة في ذات الوقت

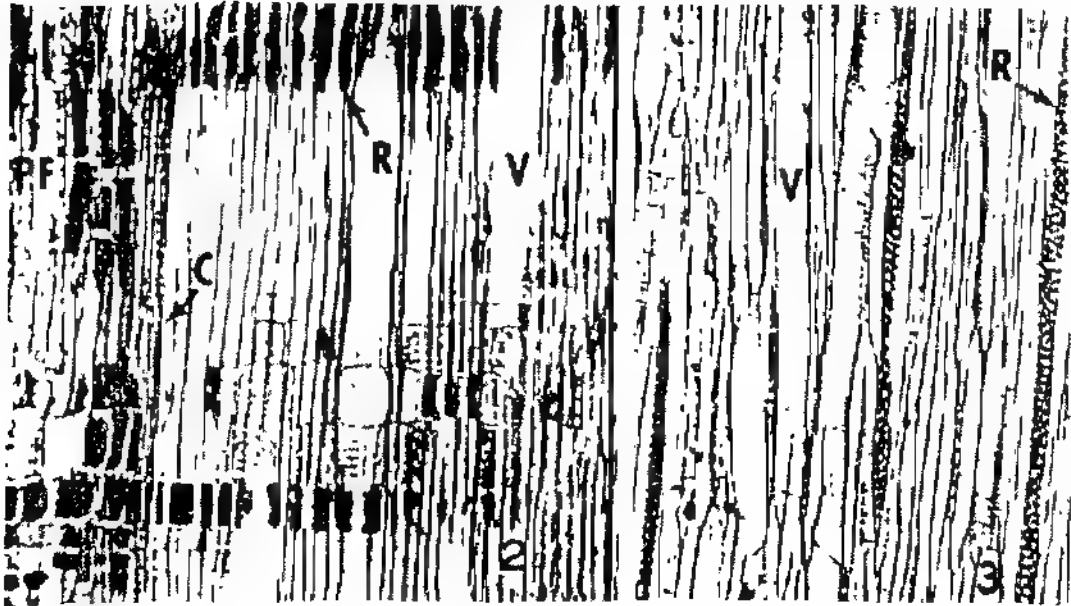
وتتارى مصانع البصريات فى تقديم كل حديث من المحققات التى تضاف إلى المجهر  
والتي تساعد الباحثون فى الحصول على أدق وأفضل النتائج .

#### فحص الشرائح بالمجهر الضوئى Slide analysis by light microscope

لا يقف الأمر عند تحضير شرائح عالية الجودة، بل يلزم فحصها، وإمكانية تعرف أنواع  
الخلايا فى الأنسجة المختلفة، وكذلك تحديد مكوناتها، وهذا يتطلب بطبيعة الحال دراسة علم  
تشريح النبات حتى يتمكن الدارس من قراءة الشريحة بدقة . بداية تفحص الشريحة بصورة  
جمالية حتى يمكن تعرف الأنسجة المختلفة بالعينة، واستجابة الأجزاء المختلفة منها للصبغات  
المستخدمة، وذلك يتطلب خبرة ومهارة خاصة، وعموماً يمكن تباع ما يلى :

(١) تحدد المواضع والأشكال النسبية لكل طرر من الخلايا فى كل نوع من الأنسجة، كما  
يلزم الإلمام بالوظائف العامة للأعضاء تحت الدراسة، ويفضل الرجوع إلى عيات  
مرجعية إذا كانت متاحة بالمعمل .

- (٢) تلاحظ الاستجابة لنوعية لكل طرز من الخلايا للصبغات المستخدمة، فعادة ما يتطلب الأمر تحديد المعلومات التي تمدنا بها كل صبغة من مجموعة الصبغات المستخدمة، والتي تد تفيده كذلك فى تحديد وظيفة هذه الخلايا .
- (٣) يحدد الارتباط بين كل من تركيب والاستجابة للصبغات وموضع كل من الخلايا لرئيسية مع وظيفة العضو الجدرى دراسته .
- (٤) يراعى ما قد يوجد من اختلاف فى الاستجابة للصبغة باختلاف خطوات العمل، ومن خلال ذلك يمكن تحديد أفضل لسل الوجب اتباعها للحصول على النتائج المرجوة .
- (٥) يلزم أن يكون الدارس على وعى بكل دخيل على التحضير مثل فقاعات الهواء، وذرات التراب، وترسيبات الصبغة، وقطرات الماء، وغير ذلك - ويجب أن يغتم لدارس هذه اللحظة لسوقوف على ما قد يراه من أخطاء وعيوب فى التحضير ليتجنبه فى أبحاثه لنالية، وتبدو أهمية ذلك إذا ما تناول البحث عينات على درجة كبيرة من الأهمية أو ربما تكون عينات لأنسجة لا بديل لها .
- توضح الأشكال ( ١١ - ١٠ ) و ( ١١ - ١١ ) و ( ١١ - ١٢ ) و ( ١١ - ١٣ ) و ( ١١ - ١٤ ) قطعات فى ساق وجذر بعض نباتات ذوات الفلقة الواحدة ودوات الفلقتين كما تظهر أثناء الفحص بالمجهر . لاحظ المواضع والأشكال النسبية لكل طرز من الخلايا فى كل نوع من الأنسجة ، واختلاف استجابة كل منها للصبغات المستخدمة .



شكل (١١ - ١٠) : قطاعات في اتجاهات مختلفة لسق نوات التليا باستخدام F.A.A.

وسفرانين أخضر سريع .

(١) قطاع عرضي 40 X . (٢) قطاع قطري 200 X . (٣) قطاع مماسي 200 X .

(C) كامبيوم (CX) قشرة - (P) نخاع - (PF) ألياف لحاء - (PR) بريدرم -

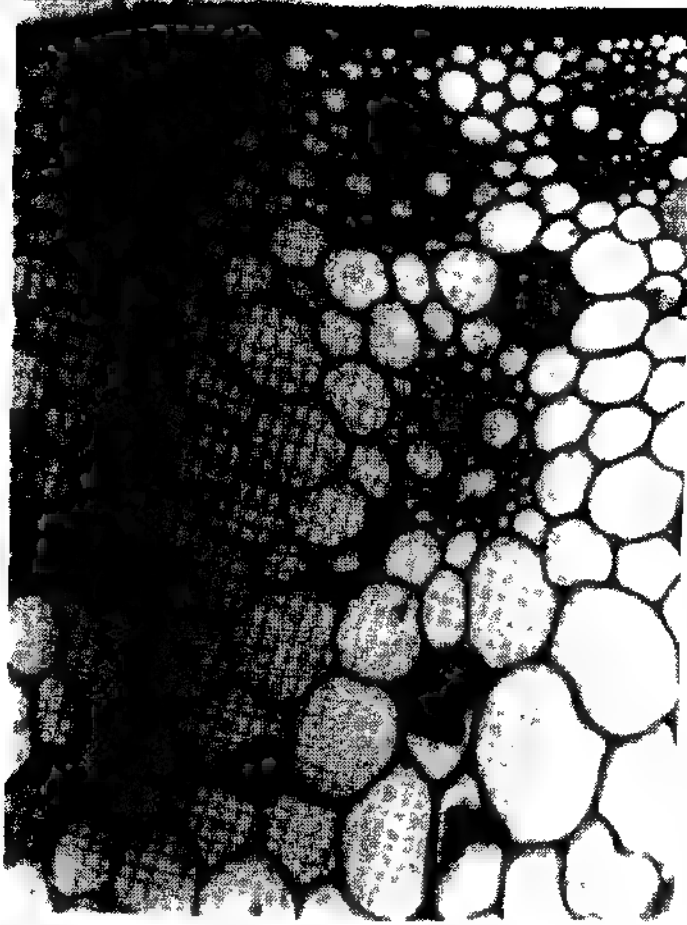
(R) شعاع وعائي - (V) وعاء خشب (ويلي Willey ١٩٧١).



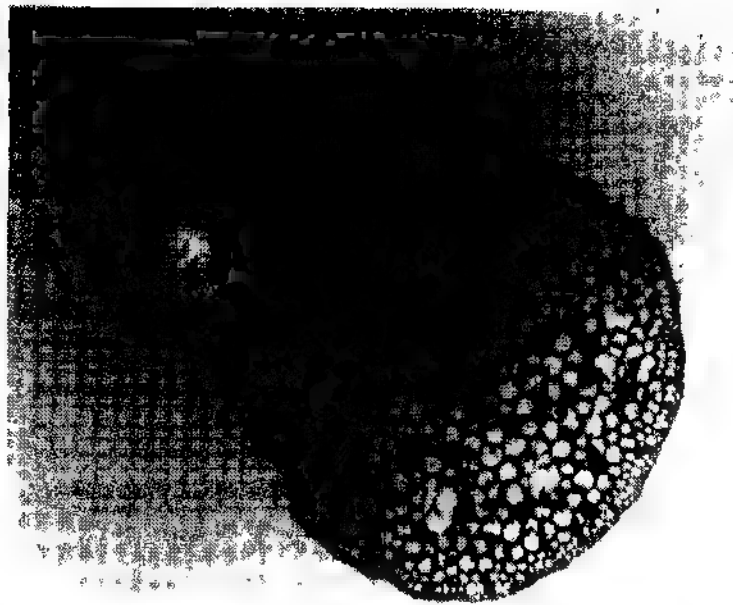
شكل (١١-١١) : قطاع عرضي في ساق نبات الثليا يوضح حلقات النمو السنوية .



شكل (١١-١٢) : قطاع عرضي في ساق نبات اللوف من النباتات ذوات الفلقتين .



شكل (١١-١٣) : قطاع عرضي في ساق نبات الدرة من النباتات ذوات الفلقة الواحدة.



شكل (١١-١٤) : قطاع عرضي في جدر نبات الشقيق من النباتات ذوات الفلقتين.



## ثالث : المجهر الإلكتروني Electron microscope

يمكن للعين المجردة في وجود إضاءة كافية التمييز بين نقطتين تبعدان عن بعضهما البعض بمسافة  $0,2$  مم أو أكثر كنقطتين منفصلتين . فإذا قلت هذه المسافة عن  $0,2$  مم تشاهدان كنقطة واحدة . وتعرف هذه المسافة بقدرة التمييز Resolving power للعين .

وإذا ما نظرنا إلى مسافة صغيرة بين نقط بمساعدة عدسة ، أو جهاز به عدسات (مجهر) تكون هذه المسافة أكبر ، ويمكن التدليل على ذلك بفحص صورة في جريدة بعدسة مكبرة . وكلما زادت قوة التكبير ، زادت قدرتنا على مشاهدة تفاصيل أدق . وعند استخدام المجهر الضوئي (المركب) (LM) Light microscope حيث يتخلل الضوء العينة يمكن التكبير نحو  $1000$  ضعف ( $1000 \times$ ) وبالتالي زيادة قدرة تمييز العين إلى نحو  $2,000,000$  مم .

خلال الدراسات المستمرة للحصول على تغيير أفضل انضح أن قدرة تمييز المجهر لا تتوقف على عدد العدسات أو نوعيتها فقط ، ولكنها تعتمد أيضاً على طول موجات الضوء المستخدم في الإضاءة ، حيث يمكن للمجهر الضوئي أن يكبر الأجسام الدقيقة تكبيراً يسمح برؤيتها إذا كان الجسم المطلوب تكبيره أكبر من طول موجة الضوء الساقط عليه ، وهذا ينطبق أيضاً على دقائق هذا الجسم ، حيث يتحتم أن تكون هذه الدقائق أكبر من طول موجة الضوء المستخدم ، وهذا لا يتأتى عند فحص الفيروسات مثلاً التي تقل في أحجامها عن طول أقصر موجة من الموجات الضوئية ، ولم يكن استعمال الضوء بالموجات الأقصر (الأزرق أو فوق بنفسجي) كافياً للخوض بعمق في التراكيب الدقيقة ، إلى أن اكتشف الإنسان في العشرينيات من هذا القرن أن الإلكترونات النشطة (أجزاء من الذرة) تسلك في الفراغ سلوك الضوء ، إلا أن طول موجاتها أصغر بنحو  $100,000$  مرة عن الضوء ، وأكثر من ذلك اكتشف أن للمجال المغناطيسي تأثيراً على الإلكترونات مماثل لتأثير العدسات لزوجانية على الضوء المرئي .

تمكن العالم أرنست رسكا Ernst Ruska بجامعة برلين والسذي نال جائزة نوبل عن أعماله عام ١٩٨٦ من الاستفادة من هذه الخصائص في تصميم أول مجهر إلكتروني متخلل عام ١٩٣١ Transmission electron microscope (TEM) ولقد تطورت هذه الصناعة حتى أمكن حالياً استخدام خمس عدسات كهرومغناطيسية Electromagnetic lenses في

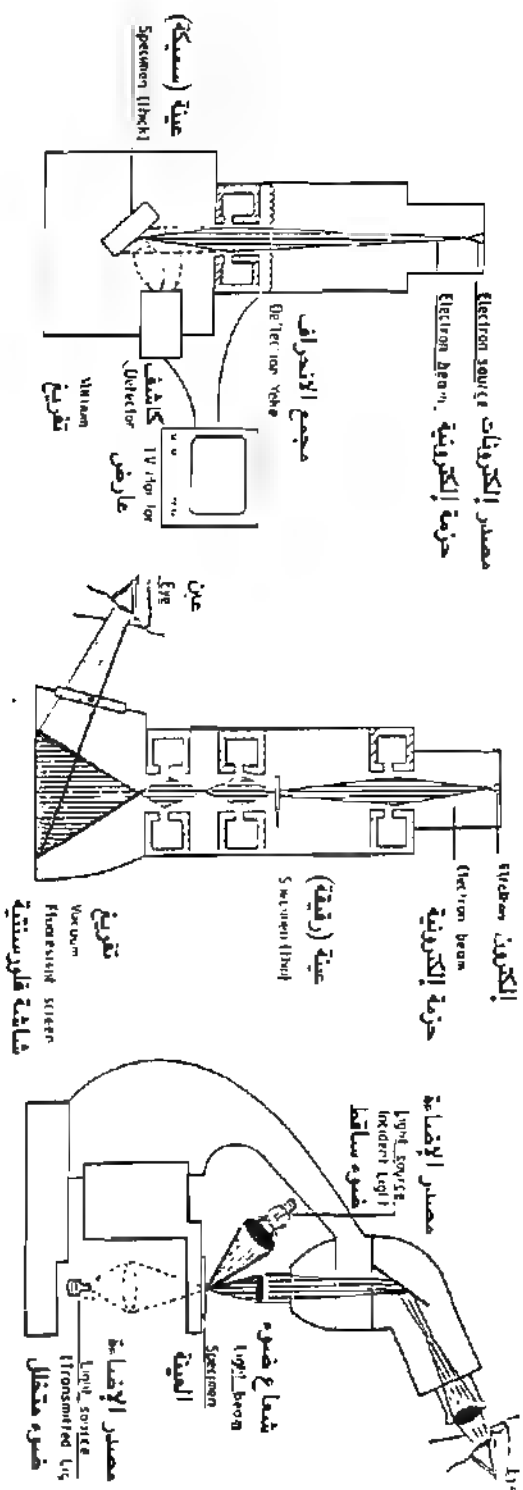
نظام التصوير تعطي قدرة تمييز تصل إلى نحو  $3 \times 10^{-3}$  نم \* وقوة تكبير نحو مليون مرة. وعموماً يجب أن يتمشى نظام البصريات (الإلكترونات) مع قدرة التمييز المطلوب توافرها للعين، ويجب أن تكون قوة التكبير على الأقل مساوية لقدرة تمييز العين، مقسومة على قدرة تمييز لنظام المستخدم (شكل ١١ - ١٥).

يستخدم المجهر ذو الضوء المنعكس (RLM) Reflected light microscope في دراسة سطح العينة، وفي هذه الحالة أيضاً يكون طول موجة الضوء المستعمل لإضاءة لعينة عائناً للحصول على قدرة تمييز أفضل. وبالتالي فقد اتجه التفكير إلى الإلكترونات كبديل أفضل من الضوء. عند تحميل العينة رأسياً في المجهر الإلكتروني المتخلل TEM، إذ ارتطم الشعاع الإلكتروني بالسطح بزاوية صغيرة جداً تنتج صورة لسطح العينة. ومع ذلك ولأسباب عديدة لم تستخدم هذه الطريقة بصفة عامة لدراسة الأسطح، وأمكن حديثاً فقط تطبيق هذه الطريقة بصورة مرضية في بعض الدراسات الخاصة (شكل ١١ - ١٥).

لقد أمكن بنجاح أكبر دراسة الأسطح باستخدام لشعاع لمساح بدلاً من الشعاع الثالث مع نظام تصوير خاص - ويعرف في هذه الحالة بالمجهر الضوئي المساح (SEM) Scanning electron microscope. ولا يعرف على وجه الدقة من وضع الأسس الأولى للمجهر الضوئي المساح، ومع ذلك فإن أول وصف بشر جهاز يستخدم شعاعاً إلكترونياً مساحاً للحصول على صورة للسطح قام به عالم الطبيعة الألماني ماكس بول Max Knoll عام ١٩٣٥، وترد حالياً قوة تكبير المجهر الضوئي المساح عن ١٠٠ و ١٦٠ مرة، وتبلغ قدرة تمييز ٤ نم (شكل ١١ - ١٥).

نعرف مجموعة لأسس مستخدمة مع كل من TEM و SEM بالفحص المجهرى الإلكتروني المساح المتخلل Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) ولقد وصفه أردين Mazred v Ardenne للمرة الأولى عام ١٩٣٨، وتستخدم أول جهاز نحاري جمع السوي معاً عام ١٩٦٩، وقوة تكبير ٦٠٠ إلى ١٠٠,٠ مرة، وقدرة تمييز ٢٥ نم، و حالياً تصل قدرة تمييز هذه الأجهزة المزدوجة إلى ١ نم، وقوة تكبيرها ٥٠ إلى مليون مرة.

$$(*) \text{ ١ ميكرون (Micron) = ١ ميكرومتر (Micrometer) = } 10^{-6} \text{ م} \quad \text{١ م - ١ م (Nano meter) = } 10^{-9} \text{ م}$$



(ج)

(ب)

(ا)

شكل (١٥-١١) : مقارنة بين نظم التقنية المستخدمة في : (١) المجهر الضوئي LM والمجهر ذو القوة المنعكس RLM (قوة التكبير حوالي ١٠٠٠) . (ب) المجهر الإلكتروني 'لتدخل TEM (قوة التكبير حوالي مليوناً) . (ج) المجهر الإلكتروني المساح SEM (قوة التكبير حوالي ٢٠٠,٠٠٠) (شوتانس Schotanus فيليبس).

## المجهر الإلكتروني المتخلل (TEM) Transmission electron microscope

يتركب المجهر الإلكتروني المتخلل من ثلاثة مكونات رئيسية :

(أ) عمود بصري إلكتروني Electron optical column

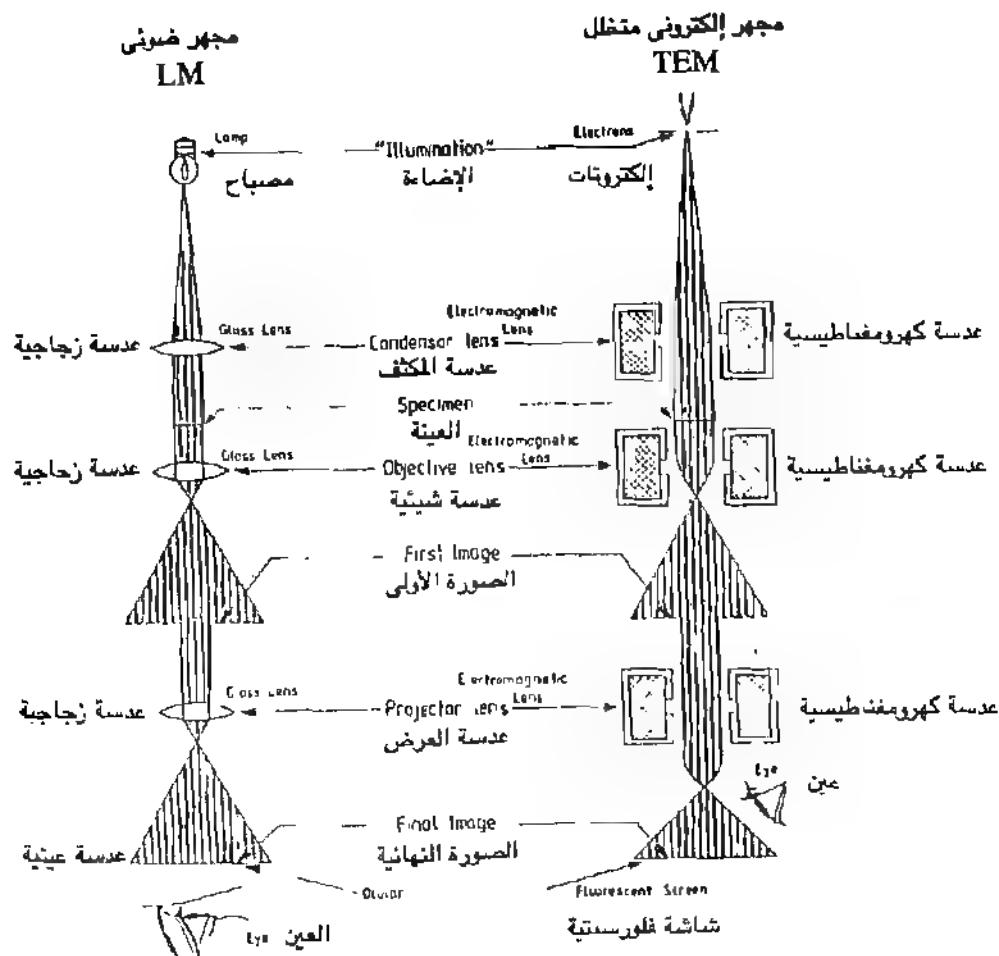
(ب) نظام تفريغ Vacuum system

(ج) الإلكترونيات اللازمة Necessary electronics

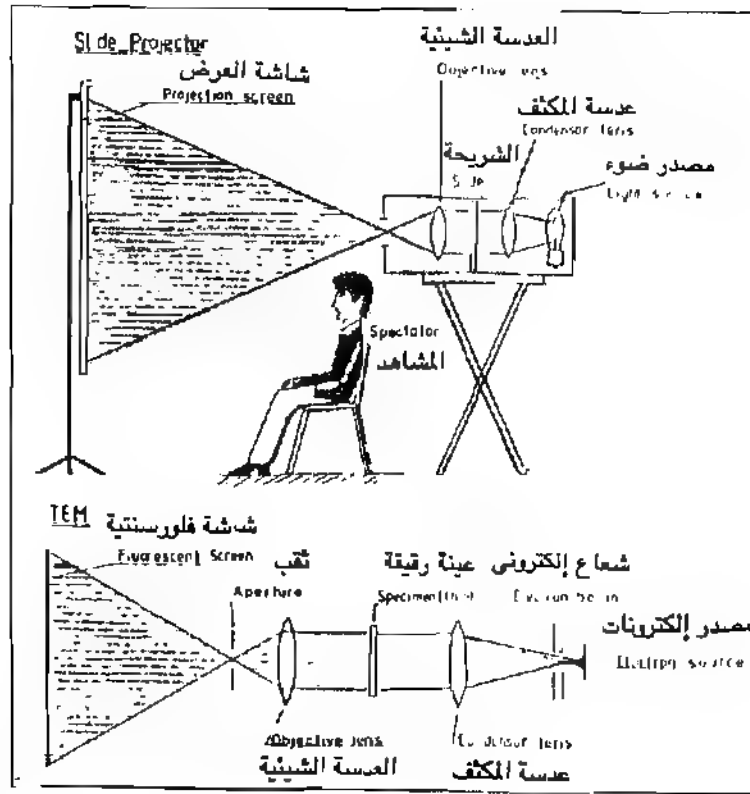
يعتبر العمود المكون الرئيسي بالمجهر الإلكتروني المتخلل ويكون على شاكلة مثبته بالمجهر الضوئي حيث تمر خلاله الإلكترونات والضوء، والفرق بينهما أن مصدر الضوء في المجهر الإلكتروني هو مدفع إلكترونات Electron gun مزود به العمود، وحيث إن الإلكترونات تكون غير مرئية يتم اعتراضها بشاشة فلورسنتية Fluorescent screen حتى يمكن رؤية لصورة خلال نافذة في حجرة العرض (شكل ١١ ١٦)

وثمة فرق جوهري آخر أن العدسات الكهرومغناطيسية تختلف، عكس الحال بالنسبة للعدسات الزجاجية، تغيير التيار خلال ملف العدسات وكذلك الطول البؤري (لذي يحدد التكبير) بسنما في حالة المجهر الضوئي يلزم تغيير العدسات المستخدمة للحصول على قوة تكبير مختلفة .

يمكن لإيضاح أسرار عمل المجهر الإلكتروني المتخلل عقد مقارنة بينه وبين عارض شرائح لفيلمية Slide projector (شكل ١١ ١٧) حيث تقابل الشريحة الفيلمية العينه التي يمحس بالمجهر الإلكتروني المتخلل .



شكل (١١-١٦) : مسار أشعة الضوء في المجهر الضوئي LM مقارنة بالإلكترونات في المجهر الإلكتروني المتحلل TEM (شوتانوس Schotanus - فيليس)



شكل (١١ ١٧) : مقارنة بين المجهر الإلكتروني المتخلل TEM وعارض الشرائح الفيلمية Slide projector (شوتانوس Schotanus - فيليس).

يتركب مدفع الإلكترونات (شكل ١١-١٨) من قطب سالب Cathode وفتيل Filament وما يعرف بالقطب الكهربائي فينلت Wehnelt electrode وتعرف هذه الأجزاء فى مجموعها بأسطوانة فينلت، إلى جانب قطب موجب Anode يكون الفتل تنجستين على هيئة دبوس شعر يحرق تسخينه إلى نحو  $2700^{\circ}\text{C}$  وكلما ارتفعت درجة حرارة الفتل، زاد الناتج من الإلكترونات بواسطة مدفع الإلكترونات، ولهذا الفتل عمر تحدده فترة زمنية معينة، وفى بعض المجاهر يستبدل الفتل المعتاد (تنجستين على شكل دبوس الشعر) بنوع خاص من البللورات يتم تسخينها، وبصفة عامة كلما زادت كمية الإلكترونات المنبعثة من المصدر المستخدم، كان قطر الحزمة الإلكترونية صغيراً وهذا يعطى تمييزاً أفضل للعينة. عند توصيل قوة محرقة كهربائية موجة عالية جداً (من  $20,000$  إلى عدة مئات لألف فولت) إلى القطب الموجب يمكن الحصول على الإلكترونات من السحابة الإلكترونية حول الفتل وبعد تجمعها على شكل حرمى بالقطب الكهربائي، تنشط إلى سرعات تصل إلى عدة مئات الألف من الكيلو مترات فى الثانية، وتمر خلال ثقب بمتصف القطب الموجب عن طريق عدسات المكثف لتتخلل العينة (لرقيقة جداً) واسعدسات المكبرة لتصطدم فى النهاية بإشاشة الفلورسنتية، التى تحول الصورة الإلكترونية إلى صورة مرئية.

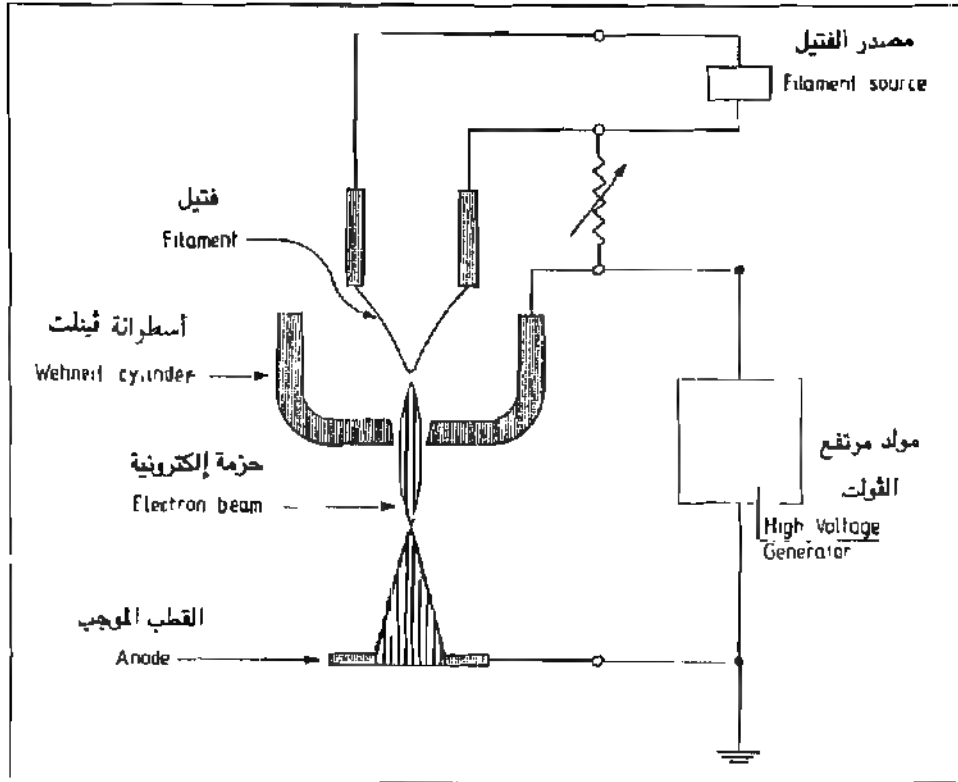
إذا لم تكن لعينه رقيقة جداً فإن الإلكترونات تقف ولا تتكون الصورة، وعادة لا يزيد سمك العينات المخترة بالمجهر الإلكتروني المختل عن نصف ميكرون، كما لا يزيد قطرها عادة عن  $3\text{ مم}$ ، لذلك كلما زادت سرعة الإلكترونات، أو بمعنى آخر كلما زادت سرعة لقوة المحركة الكهربائية، أمكن دراسة عينات أكثر سمكاً

### ماذا يحدث بالعينة أثناء قذفها بالإلكترونات ؟

عند مرور الإلكترونات خلال العينة تحدث الظواهر المتعددة التالية :

(١) تُمنص بعض الإلكترونات بسبب سمك وتركيب العينة، وهذه تريد من وضوح المروق بالصورة .

(٢) تقل سرعة بعض الإلكترونات الأخرى نتيجة لاختلاف العناصر، وهذه تعطى التقابل المظهرى Phase contrast بالصورة



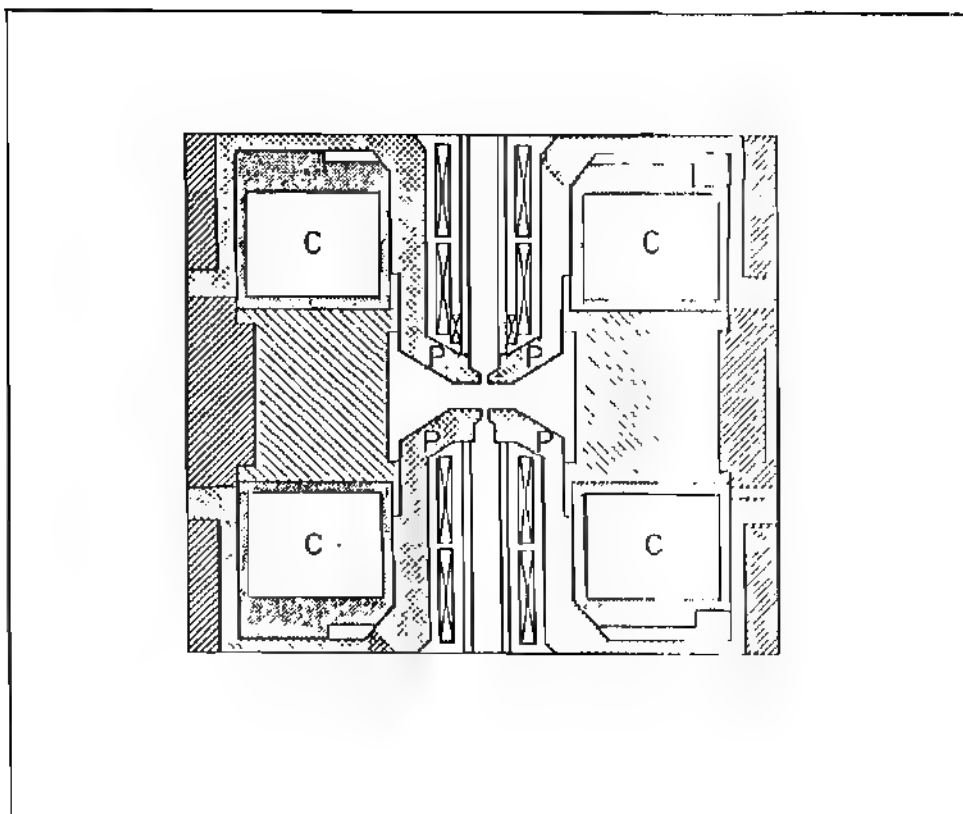
شكل (١١-١٨) . رسم تخطيطي لقطاع مستعرض لدفع للإلكترونات  
(شوتانوس Schotanus - فيليس).



- (٣) تحرف الإلكترونات في حالة العينات البلورية في اتجاهات محددة نتيجة لترتيب شبكي للعيبة وهذا يعطى نمط إحرف متميزة للعيبة .
- (٤) تنعكس بعض الإلكترونات المرتبطة بالعيبة (إلكترونات مبعثرة المحلف)
- (٥) تقذف لعيبة دنتها إلكترونات ثانوية
- (٦) تقذف لعيبة أشعة سينية ذات طاقة، وصول موجة، ترتبط بتركيب العناصر بالعيبة .
- (٧) تقذف العينة فوتونات ( ضوء ) Cathodo luminescence .

نعرض الظاهرة الأولى والثانية إلى تكوين الصورة المعتد بالمجهر الإلكتروني لتحليل لنقاسي . يمكن من خلال إضافة بعض المكونات إلي المجهر لاستفادة من الأربع ظواهر الأخيرة شكل أو تأخر ، للحصول على أقصى قدر ممكن من المعلومات عن العينة، وعلى عكس ما قد يتوقع البعض فإن الهدف للإلكتروني يمكن السيطرة عليه . وبالتالي لا يؤثر على العينة

يوضح شكل (١١ ١٩) قطاعاً مستعرضاً لترتيب المكونات عدسة كهرومغناطيسية عند مرور نياز كهرومغناطيسي خلال المنفذ الكهربائي (C) ينتج مجال كهرومغناطيسي من معروف بالقطع القطبية (١) ، ويمكن تغيير قوة تكبير العدسة بتغير اتجاه الكهرمغناطيسي خلال منفذ . ويعبر ذلك باختلاف لوحيد عن العدسة 'برحاجيه، وفيما ع ذلك مسوكتهما مسائل ، حيث إن أهم نفس السطح من الزرع (الاحرف) Aberration ويعبر لزيغ الكهرومغناطيسي عن اختلاف التكبير في المركز عن الحواف . والزيغ النوني خلاف تكبير لعدسة باختلاف طول موجة الإلكترونات في شعاع 'الضوء و الانحراف Astigmatism حسب تكون صورة لدائرة بيضاوية لشكل



شكل (١١-١٩) : قطاع مستعرض في عدمة كهرومغناطيسية

C : ملف كهربي .

P : قطعة قطب

(شوانس Schotanus فيليبس).

ويعمل نظام عدسة المكثف على ضغط الحزمة الإلكترونية (صورة الفتيل) على العينة الجارى فحصها بالقدر الذى يناسب لغرض من الدراسة. وتتكون بالعدسة لشيئية كل من الصورة الإلكترونية، ومط الانحراف (فى حالة العينة البللورية). وتعير تكبير العدسة التى تلى العدسة الشيئية مباشرة يمكن تكبير أى من هاتين الصورتين، وعرضها على الشاشة املورستية فى حجرة العرض بالعدسات الأخرى فى العمود.

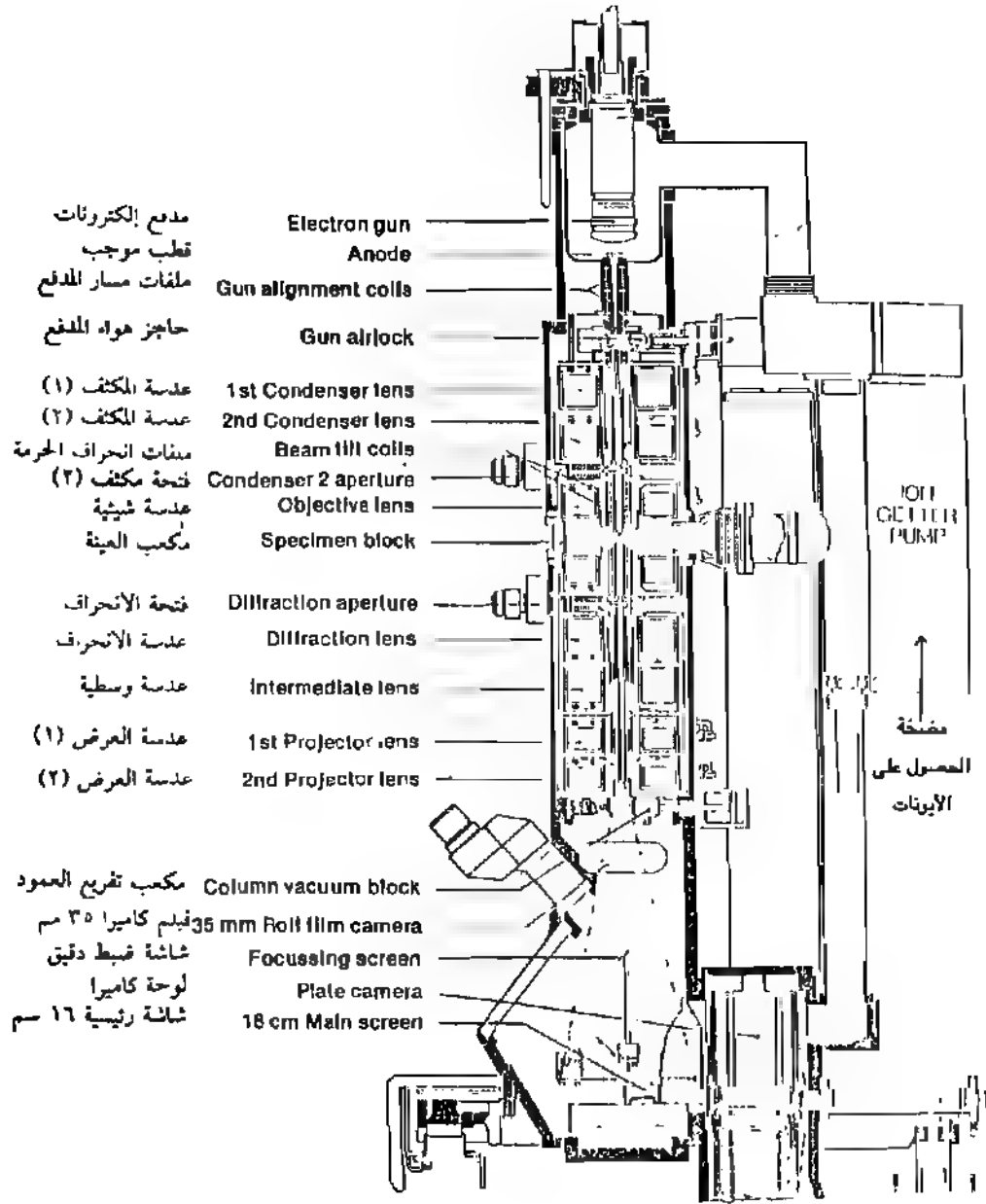
وعادة ما يعقب العدسة لشيئية أربع عدسات، وعدسة انحرافات، وعدسة وسطية، وعدستان للعرض، وقد تزود لعدسات بنظام للتبريد المائى لضمان درجة مرتفعة من الثبات والحصول على أعلى تكبير ممكن.

تمر الحزمة الإلكترونية من الفتيل إلى الشاشة الفلورستية خلال سلسلة من الفتحات مختلفة الأنطر. ويجب أن تمنع مرور الإلكترونات التى لا تفيد فى عملية تكبير لصورة. ويمكن من خلال مسك حاصر يحمل أربع فتحات مختلفة التحكم من خارج العمود وتبعاً للظروف المعينة فى اختيار قطر فتحة عدسة المكثف، والعدسة الشيئية، وعدسة الانحراف.

### مشاهدة وتسجيل الصورة Observation and recording of the image

يمكن مشاهدة الصورة على الشاشة الفلورستية من خلال نوافذ كبيرة فى غرفة العرض وعند مشاهدة لتفاصيل الدقيقة جداً للعينة، أو عندما تتطلب لصورة ضغطاً دقيقاً يمكن إعرّض الحزمة شاشة صط خاصة ذات حبيبات دقيقة جداً، وفى هذه الحالة تشاهد الشاشة بواسطة مجهر بسيط Binocular قوة (12 X) عالية الجودة.

بفص كما هو احوال فى أى من فروع العلوم الأخرى الاحتفاظ بسجل مستديم لما تشاهده العين، وفى وقع الأمر لا يتطلب الأمر أى حيل خاصة لإجراء هذا الأمر، فالإلكترونات لها نفس تأثير الضوء على المادة الفوتوغرافية وبالتالي للحصول على ما يعرف بالصورة الإلكترونية الدقيقة لا يتطلب الأمر سوى إعداد موضع أسفل عدسة العرض النهائية يوضع به حاملة Cassette بها عدد من اللوحات أو الأفلام الفوتوغرافية، وتقع هذه الحاملة أسفل لشاشة الفلورستية. يمكن تسجيل الصورة بإمالة الشاشة بعيداً، وفى بعض أنواع المجهر المتخلل يمكن وضع فيلم ٣٥ مم بإخمالة. يوضح الشكل (١١ - ٢٠) قطاعاً عرضياً بالعمود لمجهر إلكترونى متخلل حديث.



شكل (١١-٢٠) : قطاع عرضي لعمود مجهر إلكتروني متخلخل حديث.  
(شوتانوس Schotanus - فيليبس).

### المشاهدة من خلال شاشة تلفزيون Observation via T.V. screen

يمكن أيضاً مشاهدة الصورة باستعمال شاشة فلورستية شفافة (من خارج العمود المفرغ) بواسطة كاميرا تلفزيونية تنقل الصورة إلى عارض تلفزيوني T.V. monitor - ربما لا شك فيه أن هذه الطريقة تكون أفضل إذا أمكن مشاهدة الشاشة الفلورستية خلال نافذة رجالية دون إضافة كاميرا تلفزيونية .

تتضح أهمية المشاهدة التلفزيونية في التدريس ، وكذلك لتسجيل الوظائف التي تتضمن الحركة ؛ حيث تسجل على شريط فيديو .

### التفريغ Vacuum

كما سلف الذكر، يقتصر تصرف الإلكترونات مثل الضوء عند استخدامها تحت تفريغ، لذلك يلزم تفريغ كل العمود من القمة إلى القاعدة، ويتم التفريغ بكفاءة بواسطة مجموعات من المصححات المختلفة ، كذلك يتم التخلص من بخار الماء الذي يتج دائماً بالعمود عند استبدال العينات بواسطة مضخة تبريد ، وتحاط منطقة العينة بمكبب من النيتروجين السائل المبرد .

يزود العمود بعدد من حاجر الهواء، وصمامات فصل كهرومغناطيسية محكمة لتجنب إخلاء كل العمود من وقت لآخر عقب استبدال العينة، أو الحامات الفوتوغرافية، أو الفتيل.

يكون نظام التفريغ في المجاهر الإلكترونية المتخللة الحديثة محكماً ذاتياً ، ويمكن متابعة التفريغ على الجهاز بصورة مستمرة لتجنب أى خطأ قد يحدث خلال لفحص .

### الإلكترونيات The electronics

لا جدال في أن الحصول على النتائج الفائقة للمجهر الإلكتروني المتخلل الحالي يتطلب ثبات الفولت والتيار الكهربى المار خلال العدسات، لذلك تشتمل غرفة القوة الكهربائية للمجهر الإلكتروني المتخلل الحديث على عدد ملموس من المصادر، وتيار لا ينحرف بأكثر من جزء من المليون من القيمة المطلوبة للدراسة، من أجل ذلك لابد من توافر دوائر متطورة يمكن من خلالها الحصول على مثل هذا الثبات، ولا شك أن التقنية الإلكترونية الرقمية

Digital المتأخرة الآن والتقنية القائمة على المعالجة دقيقة الدقة Microprocessor تلعب دوراً حيوياً في هذا الصدد، ولقد ساعد ذلك على تقليل مفاتيح التحكم، كما أتاحت فرصة الكشف عن ظروف التشغيل مثل نظام لتفريغ في أي لحظة من خلال مفاتيح خاصة.

### توجيه والتعامل مع العينة Specimen orientation and manipulation

لا يكفي من يستخدم المجهر الإلكتروني المتحليل بحركة العينة في الاتجاه الأفقي فقط، حيث يرغب الباحث في تكوين صورة محسنة للعينة، لذلك فإنه يحتاج إلى إمالة ودوران العينة. عند توجيه عينة (بلورية) في وضع معين مع الشعاع الإلكتروني للحصول على نمط انحراف معين، يتطلب الأمر توجيه آخر في اتجاه متعامد مع التوجيه الأول، مثل ذلك وغيرها من المتطلبات كالمحصر أثناء تسخين، أو تبريد، أو ضغط مكملاً بواسطة مقياس زاوية Goniometer يوجد حول العدسة الشيئية، ويسفر مقياس الزاوية الحركية في الاتجاه الأفقي أساساً (من خلال قضيبين على جانبي العمود يتحكمان في حركة العينة) كما توجد مجموعة أخرى من القضبان حول العينة مصممة بطريقة تتيح لحركة في بقية الاتجاهات.

استخدام المجهر الإلكتروني المتحليل وإعداد العينة

### Application and specimen preparation

يمكن استخدام المجهر الإلكتروني المتحليل في أي من فروع العلوم ولتكنولوجيا المختلفة إذا ما تطلب الأمر دراسة التركيب الداخلي للعينات على المستوى الذري، على فرض إمكانية إعدادها بصورة ثابتة ودقيقة (بقطر حوالي ٣ مم) تسمح بوضعها في عمود المجهر المفرغ، ورقيقة بدرجة كافية (أقل من ٠,٥ ميكرومتر) تسمح بمرور الإلكترونات ولها القدرة على مقاومة كل من التفريغ وتأثير الشعاع الإلكتروني، وتشير لأعداد الكبيرة من الأبحاث المشورة التي ستعانت بالمجهر الإلكتروني إلى مدى أهميته للدرسين في المجالات البيولوجية والتكنولوجية المختلفة

كل فرع من لدراسة له طرق متخصصة لتجهيز العينة بالصورة الملائمة للفحص بالمجهر الإلكتروني، فعلم المعادن Metallurgy له طريقه الخاصة، وفي علم البيولوجي Biology تعامل الأنسجة بطرق خاصة، ويمكن إيجاد خطوات تجهيز العينة للفحص فيما يلي :

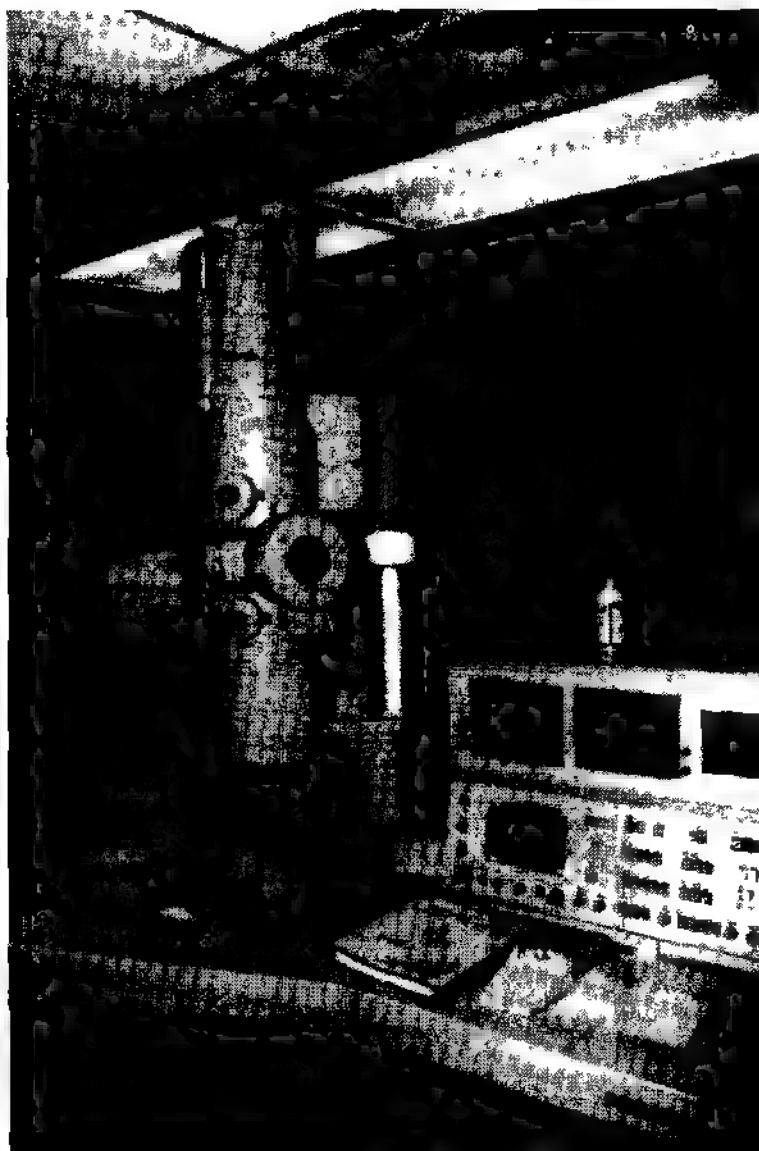
تعامل العينة بالطريقة الكيميائية المناسبة للتخلص من الماء وحفظ الأنسجة بصورة تماثل حالتها الطبيعية بقدر الإمكان، ثم توضع فى كبسولة جيلاتين (١٠ مم × ٥ مم قطر) تملأ بالراتنجات لتكتسب صلابة، تؤخذ من العينة بعد ذلك قطاعات بتوسط سمك ٥، ٠ ميكرومتر . بواسطة ميكروتوم فائق Ultra microtome مزود بسكين رجاجى أو ماسى .

توضع القطاعات الصغيرة التى يتم الحصول عليها على حامل عينة - عادة شبكة نحاسية خاصة قطرها ٣ مم ، سق طلائها ب كربون عديم التركيب بسمك ١ ، ميكرومتر ويوضح الشكل (١١ ٢١) صورة فوتوغرافية لأحد طرر المجهر الإلكتروني المتخلل

### المجهر الإلكتروني المساح (SEM) Scanning electron microscope

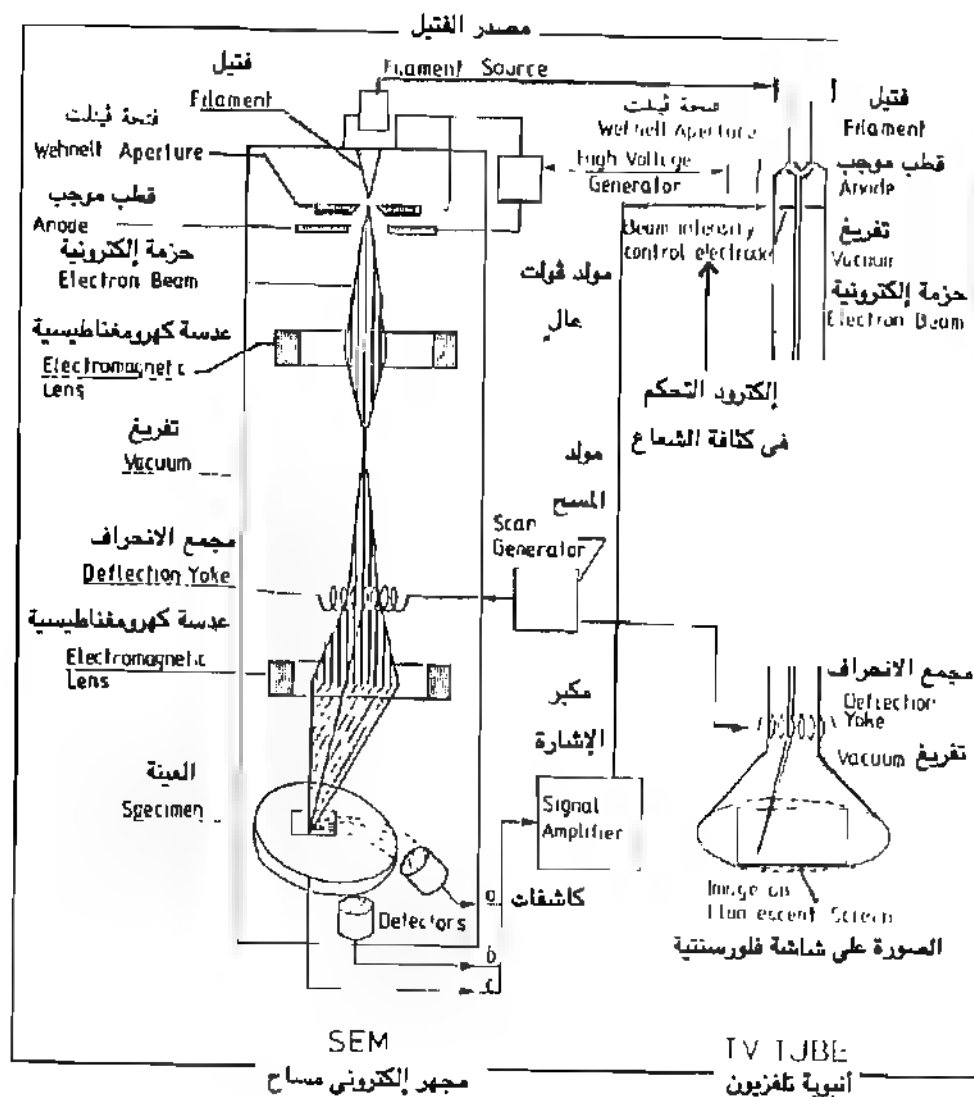
تتجمع كافة مكونات المجهر الإلكتروني مساح عادة فى ذات الوحدة، ويوجد العمود لبصرى الإلكتروني ووحدات التحكم الإلكترونية بالقمة ليسهل تداولهما ويوجد أسفل المنفعدة نظام التمريض، ومولد لفولت العالى، والمصادر لرئيسية للقوة، ومشت التير الكهربائى

وكما سبق لذكر، يماثل لمجهر الإلكتروني المساح مع بعض التحفظات لمجهر دو الضوء المنعكس، ويوضح شكل (١١ ٢٢) مقارنة أخرى، حيث يتضح أن تشغيل المجهر الإلكتروني المساح يماثل إلى حد كبير أنبوبة التشغيل المزود بها التلفزيون، حيث يوجد فى كلا لنظامين مدفع إلكترونات يماثل ذلك المزود به المجهر الإلكتروني المتخلل ، الذى يعطى شعاعاً إلكترونياً، وفى حالة المجهر الإلكتروني المساح يرتطم هذا الشعاع بالعينة . وخلاف ما يحدث من ظواهر أخرى، تقذف العينة إلكترونات ثانوية، وفى حالة أنبوبة التلفزيون يرتطم الشعاع بشاشة فلورسنتية التى بدورها تقذف فوتونات (- ضوء). يسمح الشعاع الإلكتروني مساحة صغيرة من سطح العينة خطأ بعد خط، متزامناً مع اشعاع لإلكترونى فى أنبوبة التلفزيون، ويقوم الكاشف Detector بالتقاط الإلكترونات الثانوية التى تتولد خلال هذه العملية بواسطة كل نقطة من العينة على حدة، وتتحكم الإشارة لصادره عن الكاشف فى كثافة الشعاع فى أنبوبة التلفزيون، وبالتالي تكون كمية الضوء التى تقذفها كل نقطة من شاشة التلفزيون متناسبة مع عدد الإلكترونات من النقطة المقابلة على سطح العينة. وبالتالي تظهر الصورة المثلثة لسطح العينة على شاشة التلفزيون خطأ بعد خط .



شكل (٢١-١١) . المجهز الإلكتروني المتخيل .





شكل ( ١١ - ٢٢ ) . مقارنة بين نظام التشغيل في المجهر الإلكتروني المساح وأنبوبة التليفزيون ( شوتانوس Schotanus - فيليبس )

يجرى التسجيل بتصوير شاشة التلفزيون، حيث يفتح غالق Shutter كاميرا عادية عندما تبدأ عملية المسح ويقفل عقب كتابة آخر خط .

وفيما يلي وصف لمختلف أجزاء المجهر الإلكتروني المساح . وبعض أوجه التقسية الخاصة به .

### مدفع الإلكترونات Electron gun

يتركب مدفع الإلكترونات من قنبل، وأسطوانة ثلث تماثلان نظيريهما في المجهر الإلكتروني المتخلل، كذلك لا يختلف الأساس الذي يقوم عليه نظام الإضاءة حيث يتركب من مدفع إلكترونات + قطب موجب + عدسات المكثف، تقوم العدسة النهائية بضبط الحزمة على سطح العينة المطلوب فحصها .

وتتمثل أهم الفروق فيما يأتي :

- (١) الحزمة ليست ساكنة Static كما في المجهر الإلكتروني المتخلل ؛ حيث تقوم الحزمة بمسح جزء متناه في الصغر من سطح العينة بمساعدة محال كهرومغناطيسى ، نأتج عن ملفات مسح يحكمها ما يعرف بمولد المسح Scan generator .
- (٢) فولت التنشيط أكثر انخفاضاً في المجهر الإلكتروني المساح عنه في المجهر الإلكتروني المتخلل ؛ حيث يتراوح في الأول ما بين ٢ إلى ٣٠٠٠ فولت .

والسؤال الآن، ماذا يحدث بالعينة عند انطلاق الإلكترونات ؟

سبق مناقشة الظواهر المتعددة التي تصاحب قذف العينة بالإلكترونات ، عند استخدام المجهر الإلكتروني المتخلل، وعموماً نلاحظ انضواهر الخمس التالية عند استعمال المجهر الإلكتروني المساح

- (١) ينبعث عن العينة ذنها م يعرف بالإلكترونات الثانوية .
- (٢) تنعكس بعض الإلكترونات (الإلكترونات التي تشتت إلى الخلف) .
- (٣) تمتص العينة إلكترونات
- (٤) ينبعث عن العينة أشعة سينية .

(٥) ينبعث عن العينة أحياناً فوتونات (- ضوء)

أصف إلى ذلك ظاهرة سادسة هي إنتاج ما يعرف بالإلكترونات الثاقبة Auger electrons تحت تأثير الأشعة السينية المنبعثة

تتداخل كل هذه الظواهر معاً ويعتمد كل منها إلى حد ما على التضاريس، والعدد الذرى، والحالة الكيميائية للعينة، ويعتمد عدد الإلكترونات التى تنشئت إلى الخلف، والإلكترونات الثانوية المنبعثة، والإلكترونات التى تمتص عدد كل نقطة بالعينة على تضاريس العينة بدرجة كبر من ثبة لخاصية أخرى، ولذلك السبب تستعمل هذه الظواهر الثلاث بصورة أساسية لتصوير سطح العينة

### الكشف عن الإلكترونات Electron detection

تعمل كافة المكشافات عن الإلكترونات التى تنشئت إلى الخلف والإلكترونات الثانوية التى تسعت من لعينة على أسس وحدة حيث تصدم للإلكترونات شاشة فلورسنتية، ونتيجة لذلك ينبعث عن الشاشة فوتونات وهذه يتم الكشف عنها وتحويلها إلى إشارة كهربائية بواسطة أنبوبة بقوة الضوء Photomultiplier tube. عدد وضع قطب كهربائى Electrode موجب الشحنة على هيئة قنص حول مقدمة المكاشف فإن كفاءة الكشف للإلكترونات الثانوية تكون أفضل

### التكبير والإظهار Magnification and resolution

يجرى تحديد التكبير فى المجهر الإلكتروني المساح بواسطة الدائرة الإلكترونية التى مسح الحزمة فوق لعينة (وفى ذات الوقت فوق الشاشة الفلورسنتية لأنبوبة التلغزيون حيث تظهر الصورة) وفوق مقطع أنبوبة التلغزيون

طول أحد الخطوط (التي تكبها) الحزمة الإلكترونية على

شاشة التلغزيون (عرض صورة التلغزيون)

تكبير المجهر الإلكتروني المساح =  $\frac{\text{طول أحد (مسرات) الحزمة الإلكترونية على لعينة}}{\text{طول أحد الخطوط (التي تكبها) الحزمة الإلكترونية على شاشة التلغزيون (عرض صورة التلغزيون)}}$

يتحدد إظهار المجهر الإلكتروني المساح بصورة أساسية بواسطة قطر الحزمة على سطح العينة، ومع ذلك يعتمد الإظهار من الناحية العملية على خصائص العينة، وتقنية إعدادها،

وعلى عديد من القياسات الجهازية مثل كثافة الحزمة، والفولت المنشط، وسرعة المسح، والمسافة بين آخر عدسة والعينة (تعرف عادة بمسافة الشغل Working distance) وزاوية سطح العينة مع لكاشف، ويمكن تحت ظروف المثلى الحصول على إظهار قدره ٤ مم.

### مشاهدة وتسجيل الصورة Observation and recording of the image

يزود المجهر الإلكتروني المساح عادة بعارضين للصورة Image monitor يشاهد الباحث الصورة من خلال أحدهما، أما الآخر ويعرف عادة بالعارض عالى الإظهار High resolution monitor فيرود بكاميرا تصوير عادية ذات فيلم ٣٥ مم أو ٧٠ مم أو طراز مناسب من كاميرا بولارويد Polaroid إذا تطلب الأمر الحصول على صور قورية.

### معاملة الصورة Image treatment

لما كان الحصول على الصورة فى المجهر الإلكتروني المساح يتم بالكامل إلكترونياً فإن من الممكن معاملتها بمختلف الأساليب الإلكترونية الحديثة، والتي تشتمل على تعظيم الاختلافات، والتعاكس (الأسود يصير أبيض) ومزج الصور من كاشفات مختلفة، وتحليل الصورة، واستخراج صورة أحد الكاشفات، وبالتالي يمكن الاستفادة من مختلف هذه التقنيات التي تناسب الحصول على أفضل البيانات الممكنة من العينة.

### التفريغ Vacuum

يجرى فى المجهر الإلكتروني المساح، بصفة عامة، الحصول على تفريغ منخفض ونظيف بمساعدة مضخة قبل تفريغ رحوية ومضخة انتشار زيتية أو م يعرف بالمضخة التربينية الجزئية.

توفر هذه التوافيق أيضاً فترة كافية لتغيير العينة والفتيل والفتحة بصورة مرغوبة (أقل من دقيقتين) دون الحاجة إلى استخدام حاجز هواء، وكما هو الحال فى المجهر الإلكتروني المتخلل فإن نظم التفريغ فى المجهر الإلكتروني المساح تقع تحت تحكم ذاتى تام ومؤمنة ضد أعطال التشغيل.

## الإلكترونيات Electronics

من البديهي أن المجهر الإلكتروني المساح مثل المجهر الإلكتروني المتخلخل من حيث حاجته إلى ثبات الفولت والتيار اللارمين لمُدفع الإلكترونات وعدسات المكثف للحصول على أفضل تمثيل، وبالمثل يلزم إحكام تثبيت الدائرة الإلكترونية المصاحبة للكاشفات بدقة بالغة، فالحال هنا يماثل المجهر الإلكتروني المتخلخل حيث لا يسمح بالتجاوز بجزء في المليون .

### توجيه والتعامل مع العينة Specimen orientation and manipulation

تعتمد مرعية الصورة بالمجهر الإلكتروني المساح على توجيه وبعد العينة بالنسبة للكاشفات الإلكترونية، لذلك يراعى في المجهر الإلكتروني المساح حاليًا حرية حركة العينة في الاتجاهين الأفقي والرأسي كذلك إمكانية دورانها وإمالتها تبعًا للحاجة، وعادة ما يكون حجم العينة في المجهر الإلكتروني المساح أكبر من تلك بالمجهر الإلكتروني المتخلخل، حيث يمكن استخدام عينات يصل حجمها إلى  $60 \times 60 \times 50$  مم، وقد تضيف بعض المصانع إمكانية فحص العينة تحت تبريد أو تسخين أو تعريضها للشد .

### استخدام المجهر الإلكتروني المساح وإعداد العينة

#### Application and specimen preparation

يستخدم المجهر الإلكتروني المساح في عديد من فروع العلم والتكنولوجيا عندما تكون هناك حاجة إلى دراسة سطح العينة، وتحدد القيمة الشرائية للجهاز من انتشار استخدامه .

يمكن فحص أى عينة كما هي بالمجهر الإلكتروني المساح عقب التخلص مما بها من مكونات متطايرة مثل الماء، وإمكانية فحص العينات بحالتها له أهمية عظيمة في حالات خاصة كما في الأمور الشرعية، ومع ذلك يتطلب الحصول على نتائج أفضل من الإلكترونات وبالتبعية صورة أكثر دقة إضافة طلاء معدني (عادة ذهب) رقيق للغاية (١ نـم) وعادة ما يزود المجهر برشاش طلاء Sputter coater لهذا الغرض .

ويوضح الشكل (١١-٢٣) صورة فوتوغرافية لأحد طرز المجهر الإلكتروني المساح .



Hitachi Scanning Electron Microscope (SEM)

شكل (١١-٢٣) : المجهر الإلكتروني المساح.

## الفحص المجهرى الإلكتروني المساح المتخلل

### Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)

عندما تكون العينة فى المجهر الإلكتروني المساح شفافة بدرجة تكفى للإلكترونات أن تتحللها فمن الممكن تجميع هذه الإلكترونات بكاشف إلكترونات متخللة يوضع فى مكان مناسب، يعرف هذا الاتحاد بين أسلوبى تقنية المجهر الإلكتروني المساح والمجهر الإلكتروني المتخلل بالفحص المجهرى الإلكتروني المساح المتخلل STEM .

يمكن الحصول على نتائج مماثلة عندما يسمح للحزمة الإلكترونية فى المجهر الإلكتروني المتخلل أن تمسح العينة ويتزامن مع ذلك حزمة إلكترونية فى أنبوبة تلفزيون كما هو الحال فى المجهر الإلكتروني المساح، ويحمل أسفل عدسة العارض النهائية كاشفاً إلكترونياً متخللاً، ويمكن حالياً تزويد معظم المجاهر الإلكترونية المتخللة بهذه الإمكانية سواء كجزء إضافي أو جزء أساسى داخل المجهر، ويمكن لهذه التقنية التكبير حتى مليون ضعف وبقوة تمييز 1 نـم .

ولقد أمكن الاستفادة من الإلكترونات التى تشتت إلى الخلف ، وكذلك الإلكترونات الثانوية التى تنبعث أثناء قذف العينة للحصول على معلومات أكثر عن العينة التى تفحص بالمجهر الإلكتروني المتخلل ، حيث يوضع كاشف إلكترونى من النوع الرقيق جداً شبه الموصل أسفل القطب العلوى للشبيثة للحصول على صورة الإلكترونات التى تشتت للخلف لسطح العينة على عارض التلفزيون ، ويتم توجيه الإلكترونات الثانوية إلى الكاشف من خلال ثقب فى القطب أعلى العدسة الشبيثة ، بإضافة فولت موجب لقطب كهربائى أمام الكاشف الإلكتروني مباشرة الذى يمكن تحميله على العمود المصرى الإلكتروني وبالتالي نكون قد أضفنا إمكانيات المجهر الإلكتروني المساح إلى المجهر الإلكتروني المتخلل ، والحصول على معلومات عن العينة تشمل دقائق تركيبها الداخلى ، وكذلك السطح .

### Tissue preparation تجهيز العينات

يقتضى تجهيز لنسيج للفحص بالمجهر الإلكتروني مجموعة من الخطوات المتتالية تضمن التثبيت Fixing حتى تكتسب الأنسجة صلابة وقدرة على الحفظ ثم التجفيف Dehydrating ثم التشرب Infiltrating بمادة يمكن أن تتصلب بعد ذلك لتوفر مادة مناسبة

لعمل قطاعات رقيقة. ومن الأمور ذات الأهمية القصوى الحفاظ على التفاصيل الدقيقة للنسيج فى حالة أقرب ما تكون للنسيج الحى

### الحصول على العينات Obtaining material

الحصول على العينة أولى خطوات تجهيز النسيج للفحص المجهرى، ويتطلب ذلك اختيار المصدر المناسب للدراسة المطلوبة والقائم على طبيعة المادة والخطوات المزمع إجراؤها، ومن نقاط الواجب مراعاتها سرعة إجراء عملية تثبيت بمجرد أخذ العينة بقدر الإمكان حتى لا يتأثر مظهر التركيب المجهرى للنسيج

### التثبيت Fixation

أفضل محلول تثبيت لنسيج معين هو بطبيعة الحال ذلك الذى يحفظ الأنسجة تحت الدراسة على أكمل وجه، والمشكلة هى تحديد هذا المحلول حيث إنها عملية معقدة للغاية، وتتطلب جهداً فائقاً لكثرة المتغيرات التى تحكمها مثل اختيار الجوهر للتثبيت، ودرجة الحموضة، ودرجة الحرارة، والفترة اللازمة وغير ذلك من الظروف المصاحبة لإجراء عملية التثبيت، ولا شك أن لنتائج الباحثين السابقين أهميتها فى هذا الصدد ولكن يبقى على الباحث ذاته تحديد الظروف اللازمة لعينته بالذات .

يستخدم رابع أكسيد الأوزميوم ( $\text{OsO}_4$ ) Osmium tetroxide مع المحلول المظم Acetate - veronal buffer بكثرة مع المجهر الإلكتروني أكثر من أى مثبت آخر، وإن تعددت المحاليل المستخدمة حديثاً وينصح عادة بمراعاة درجة الحموضة عند ٧,٣ إلى ٧,٥ حيث تؤدي حموضة الوسط إلى ظهور الشوائب فى التحضير، وقد يستخدم البعض أكثر من مثبت على التوالى كاستخدام الدهيدات معينة مثل الجلوتارالدهيد Glutaraldehyde عقب رابع أكسيد الأوزميوم حيث يعطى نتائج تثبيت أفضل .

تجرى عملية تثبيت عادة قريباً من درجة الصفر المئوى، حيث تساعد درجة الحرارة المنخفضة على زيادة حجم الجزء من العينة الذى يتم تثبيته كما تقلل من تسرب لمكونات الخنوية أثناء التثبيت .



تحدد الفترة اللازمة لإجراء التثبيت بالمواءمة بين إقدام التثبيت من جهة وتسرب المكونات الخلوية من جهة أخرى، لذلك يفضل أن تكون الفترة قصيرة ما أمكن، وعموماً تتراوح الفترة المتبعة ما بين ٣٠ دقيقة إلى ساعتين تبعاً لحجم وكثافة العينة .

### المحاليل المثبتة Fixatives

(١) مثبت باليد Palade's fixative وهو عبارة عن محلول منظم من ١ ٪ رابع أكسيد الأورميوم، وقد شاع استخدامه لسين عديدة بعد استعماله لأول مرة عام ١٩٥٢، ويعتبر الأساس لكثير من المحاليل التالية له، ويتركب من .

Buffer stock solution	(0.28 M)	
Sodium veronal (sodium barbital)		2.88 gm.
Sodium acetate (anhydrous)		1 15 gm.
Water to make		100 ml.
0.1 N HCl		
Concentrated HCl (36 % , 11.6 M)		8.6 ml.
Water to make		1 liter
Stock OsO <sub>4</sub>	(2 %)	
Crystalline OsO <sub>4</sub>		2 gm.
Water to make		100 ml.

يذوب رابع أكسيد الأورميوم ببطء عند درجة حرارة الغرفة، لذلك يلزم تسخين الماء إلى درجة حرارة ٦٠ °م أو أكثر حتى تذوب لبلورات وتسرع من تكوين المحلول، كما يساعد الراج بشدة أيضاً، وقد يتوفر رابع أكسيد الأورميوم كمحلول ٢ ٪ فى أنابيب زجاجية (٥ مل) محكمة الغلق، يحفظ هذا المحلول على درجة حرارة الغرفة، أو عند ٤ °م، وقد يتغير لون المحلول مع الوقت، عندئذ يستبدل بغيره .

لإعداد مثبت باليد تضبط درجة الحموضة بالمحلول المنظم عند المستوى المطلوب (عادة ٦,٨ - ٧,٦) بإضافة حجم من 0.1 N HCl إلى حجم من المحلول المنظم الأساسى Buffer stock مع مراعاة إضافة الكمية الأخيرة من HCl ببطء مع التأكد من

درجة الحموضة وعند تمام ضبط درجة الحموضة يضاف ماء مقطر بحيث يصبح الحجم الإجمالي  $\frac{1}{2}$  ضعف حجم المحلول المنظم الأساسي، يخطط المحلول المنظم المتعاد مباشرة (حتى لا يتبلور) مع حجم مماثل من محلول ٢ / رابع أكسيد الأوزميوم ليعطى لمحلول المثبت النهائي (محلول مضم ١ / رابع أكسيد لأوزميوم) وتركيبه بإيجاز .

Buffer stock solution	2 vol.
0.1 N HCl to desired pH	2 vol.
Distilled water to make 5 vol.	1 vol.
2 % OsO <sub>4</sub> stock	5 vol.
Final mixture	10 vol.

## (٢) رابع أكسيد الأوزميوم - كلوريد صوديوم OsO<sub>4</sub> · Na Cl

قد يضاف كلوريد الصوديوم لزيادة كفاءة مثبت باليد، حيث يساعد ذلك على الحد من انتفاخ المكونات السليولوزية في بعض الحالات نتيجة لزيادة الضغط الأوزموزي للمحلول، ويضاف لكل ١ - ١ مل مقدار ٠,٦ جم كلوريد صوديوم .

## (٣) رابع أكسيد الأوزميوم - سكروز OsO<sub>4</sub> - sucrose

ينصح البعض إضافة ٤,٥ جم سكروز لكل ١٠٠ مل من المثبت، ويعمل السكرور على رفع الضغط الأوزموزي للمثبت

## (٤) مثبت دالتون كروم - أوزميوم Dalton's chrome osmium fixative

يتميز هذا المثبت بانخفاض تسرب المحتويات البروتوبلازميه ، ويتركب من :

4 % K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> brought to pH 7.2 with KOH	1 vol.
3.4 % Na Cl	1 vol.
2 % OsO <sub>4</sub>	2 vol.
Final mixture	4 vol.

## (٥) مثبت لوفو كروم - فورمالين Low's chrome - formalin fixative

وينصح باستخدامه في حالة الخلايا ذات لشبكة الإندوبلازمية الكثيفة وتركب من .

Cr O <sub>2</sub>	3 %
Formalin	10 %
Na Cl	0.8 %

(٦) البرمنجنات Permanganate

ويترك من

1.2 % stock solution of KMn O<sub>4</sub> 1 vol

Neutralized acetate - veronal buffer

(كما سبق في مثبت باليد) 1 vol

Final mixture 2 vol

(٧) مثبت رابع أكسيد الأوزميوم محلول منظم من الكوليدين

s - Collidine buffered Os O<sub>4</sub> fixative

يرى البعض أن المسحوق المضم acetate - veronal buffer بعض العيوب واقترح استعمال الكوليدين (2, 4, 6 - trimethylpyridine) s - collidine بدلاً عنه، حيث أنه أكثر ثباتاً وفعالية، ويجهز المحلول الأساسي منه كما يلي :

Pure s - collidine	2.67 ml
Distilled water	50 ml
NHCl	9 ml
Distilled water to make	100 ml

وتبلغ درجة حموضة هذا المحلول الأساسي نحو ٧,٤ ، ويمكن تعديله بزيادة أو نقص كمية حامض الأيدروكلوريك المستخدمة، ويحفظ المحلول لحين الحاجة ويجهز المثبت بإضافة حجم من المحلول المنظم الأساسي إلى حجمين من ٢ أو ٤ ٪ رابع أكسيد الأوزميوم في ماء مقطر .

## (٨) مثبت الأكرولين Acrolein fixative

يعطى مثبت الأكرولين (Acrylic aldehyde) نتائج طيبة في حالة العينات النسيجية الكبيرة نسيئاً، فهو سريع التخلل جداً، ويعمل إذا استخدم بعده مثبت يحتوى على رابع أكسيد الأوزميوم على حفظ المكونات لدقيقة بصورة جيدة . يستخدم الأكرولين بتركيز ١٠ ٪ في محلول منظم درجة حموضته ٧,٣ إلى ٧,٥ لمدة ١٥ إلى ٤٥ دقيقة على حرارة الغرفة، ويراعى استعمال هذا المثبت بحرص بالغ لشدة سميته .

(٩) رابع أكسيد الأوزميوم مع محلول منظم فوسفاتى Phosphate buffered OsO<sub>4</sub>

يجوز محلول منظم أساسى فوسفاتى كالتالى :

## Phosphate buffer stock solution (0.15 M)

Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	5.85 gm.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15.25 gm.
Water to make	1 liter

تضبط درجة الحموضة كالمطلوب ثم يذاب ١ جم رابع أكسيد الأوزميوم لكل ١٠ مل من المحلول المنظم .

## (١٠) جلودتار ألدهيد Glutaraldehyde

تعتبر بعض الألهيدات محاليل حفظ ممتازة للتركيب الدقيقة، وقد أظهر الجلوتارالدهيد نتائج طيبة في هذا الصدد، ويحضر كالتالى :

Glutaraldehyde, 25 %	2 vol.
Phosphate buffer stock (0.15 M)	5 vol.
Water	1 vol.
Final mixture	8 vol.

يحفظ المحلول في الثلاجة، ويدل انخفاض درجة الحموضة عن ٤ إلى عدم وانتهاء صلاحية المحلول، ينصح بمعاملة العينة بعد هذا المثبت بمحلول منظم دون جلوتارالدهيد، ثم استخدام أحد أنواع المثبت رابع أكسيد الأوزميوم، أحياناً تكتسب العينة صلابة وتكون القطاعات ممزقة - في هذه الحالة يخفض تركيز الجلوتارالدهيد إلى ٢ ٪ مع امتداد فترة التثبيت حتى يتم الحصول على أفضل النتائج .

### إجراء عملية التثبيت Fixation procedure

توضع العينة بعد الحصول عليها مباشرة في قطرة من المثبت على رقائق شمع مساحتها ٥,٥ × ٧,٥ سم وبسمك ٢ مم، وهي متوفرة بالمستودعات البيولوجية . تقطع العينة إلى أجزاء صغيرة حجم ١ مم في حالة رابع أكسيد الأوزميوم ، وتزيد إلى عدة ملليمترات إذا استخدم أحد الأدهيدات، يمكن التماط هذه الأجزاء بملعقة صغيرة Spatula أو قطعة شريطية من الورق ، وتوضع في زجاجة تحتوى على ١ مل أو أكثر من المثبت على درجة صفر إلى ٤°م.

### التجفيف والظمر Dehydration and Embedding

يلزم بعد تمام عملية التثبيت لأسحة العينة إجراء عمليتي التجفيف والظمر ( الصب في القوالب ). ويقصد بالتجفيف تمرير الأنسجة خلال سلسلة من الكحولات بزيادة تركيزها حتى الوصول إلى الكحول المطلق، ويتم الظمر بعد ذلك خلال مواد خاصة مثل ميثاكريليت Methacrylate ، وراتنج إيكسي Epoxy resin والجيلاتين Gelatin - يؤخذ على الميثاكريليت الانكماش عندما يتبخر كما يحدث أضراراً بالتراكيب الدقيقة، لكنه يتميز بقدرته على تخلل أنواع عديدة من الأنسجة كما يسهل القطع خلاله ينكمش راتنج إيكسي بدرجة أقل ويحافظ على التراكيب الدقيقة، لكنه يتخلل بعض الأنسجة بصعوبة، وغالباً ما يكون القطع خلاله أصعب من الميثاكريليت، ويستخدم الجيلاتين عندما تكون معاملة العينة بالمذيبات العضوية غير مرغوب فيها .

### المواد المستخدمة Materials

يفضل بعد التثبيت شطف العينة لفنرة قصيرة للتخلص من الزائد من المثبت، في حالة محاليل رابع أكسيد الأوزميوم (رقم ١، ٢، ٣، ٧، ٩) والبرمنجنات (رقم ٦) والأكرولين (رقم ٨) والجلوتارالدهيد (رقم ١٠) يستعمل محلول منظم متعادل مخفف لنصف التركيز بماء مقطر ، مع وجود نفس الكمية من كلوريد الصوديوم أو السكروز كما هو مستخدم مع المثبت . وفي حالة المحاليل الأخرى يستعمل إما محلول يئائل المثبت ، لكنه خالٍ من الجواهر المثبت أو محلول كلوريد صوديوم له ذات التركيز .

## سلسلة الكحوليات

٥٠ - ٧٥ - ٩٥ - ١٠٠ ٪ كحول إيثانيل في الماء .

يراعى خلط الكحول المطلق من الماء تمامًا Anhydrous ويحفظ في زجاجات محكمة لغلط .

## ميثاكريليت Methacrylates

يمكن حفظ كل من Acrylic resins n-butyl مع Methyl - methacrylate بسبب مختلفة لإنتاج قوالب مختلفة الصلابة، وخصائص التقطيع، ومن الأفضل أن تكون صلابة بيئة الشرب متسببة مع صلابة لعينة لظاهرة، حيث يصاحب عدم تناسبهما معاً صعوبة في الحصول على قصاعات متمثلة - ويتوفر عديد من المواد الجارية بأسماء مختلفة تستعمل كبيئة لظهور أو كمواد مساعدة لهذه لعملية .

## إيبون Epon

تتوفر راتنج الإيبون Epoxy resins تجاريًا بالاسم إيبون Epon وهي ذات كفاءة مرتفعة، نوضح لعينة المطلوب إجراء عملية الظهر لها على سطح مخلوط إيبون حديث معبأ داخل كسولة جيلاتين، تستقر معظم لعيت نقاح الكسولة قبل أن يتصلب الإيبون، ويتم نقل لعينة بواسطة عصا حشة دقيقة، أو ملعقة صغيرة

نصح باستخدام أناسب راحة رخيصة عند غمر العينات في مخلوط الإيبون للتحصص منها بعد إتمام هذه العملية، فذلك أفضل من تنظيمها، وإن أرم استطيع تعمير الرحاجيات عقب استعمالها مباشرة في الأسبون، وقبل أن تتصلب الإيبون، ثم تغسل بالوسائل المعتادة بعد ذلك .

عقب بصلب لكسولة يرفع عنها لغطاء (إن وجد) وتوضع في ماء دافئ لبضعة دقائق حتى يصير لجيلاتين رخوًا ويسهل التخلص منه، وتكون القوالب معدة للاستعمال، وينصح دائمًا بإزالة الجيلاتين قبل حفظ القوالب مهما طاللت الفترة معاً لنمو الفطريات على الجيلاتين إذا ما توفرت رطوبة .

## صبغ قوالب العينات والقطاعات الثلجية

### Staining tissue blocks and frozen sections

تعمل صبغة الأنسجة بالمعادن الثقيلة على زيادة لتباين بالصور الإلكترونية، ويفضل ذلك بصفة خاصة مع التراكييب ذات اللويقات مثل شعرة القطر .

يعطى Phosphotungstic acid (PTA) نتائج طيبة في صبغة قوالب العينات، ومن الطرق البسيطة في هذا الصدد استخدام كحول مطلق يحتوى على ١ ٪ PTA في المراحل الأخيرة من التجفيف لمدة ساعة، وتستكمل الخطوات كالمعتاد .

### فحص الخلية بالمجهر الإلكتروني Ultrastructure of the cell

يهدف لميكروتكسيك إلى إعداد سبيح ما منضمت ما تحويه خلاياه بصورة تناسب الفحص المجهرى بعد ذلك، لكن عدة ما يتطلب الأمر المزيد من المعرفة عن التركيب الدقيق لهذه الخلايا كما تشاهد بالمجهر الإلكتروني، وفي هذا المجال يبدو منطقياً الإشارة إلى خلية نموذجية Typical cell وإن كان ذلك غير متاح عميقاً حيث يتطلب الأمر دراسة كل نمط من الخلايا على حدة - ومع ذلك فقد أمكن مشاهدة عضيات معينة في عديد من الخلايا وهذه تعتبر من الملامح العامة لكل الخلايا بالكائنات الحية الراقبة في مملكة النبات ومملكة الحيوان أهمها ما يلي :

#### The cell membrane (CM) الغشاء الخلوي

وهو الحائل الرئيسى بين كل من البيئة الداخلية والحرية للخلية، ويتولى حماية السيتوبلازم كما يتحكم في الاتصال بالوسط الخارجى للخلية، وغالباً ما يرى من خلال المجهر الإلكتروني على هيئة خطين كثيفين متوازيين يغلفان فراغاً إلكترونياً شفافاً

#### النواة The nucleus (N)

تفصل النواة عن السيتوبلازم بعشاء نووى مزدوج، بداخلها النوية Nucleolus التى تحتوى على تركيز مرتفع من RNA ولنوية كبيرة جداً في الخلايا النشطة في تمثيل البروتين، وتحتوى نقاط الكروماتين على تركيز مرتفع من DNA .

### الشبكة الإندوبلازمية The endoplasmic reticulum

قد تكون الشبكة الإندوبلازمية ناعمة أو فد يحدها ريبوسومات Ribosomes ،  
تصاحب الشبكة الإندوبلازمية غير المحبة الخلايا التي تمثل أجليكوجين (فى الكبد) بينما  
تصاحب الشبكة الإندوبلازمية المحبة تمثيل البروتين .

### أجسام جولجي Golgi apparatus (GA)

تشهد بالخلايا التي تقوم بالإفراز .

### الميتوكوندريا The mitochondria (M)

تحتوى على إنزيمات لأكسدة، وتمثل مواقع انتقال الطاقة المستخدمة ATP فى الخلية .

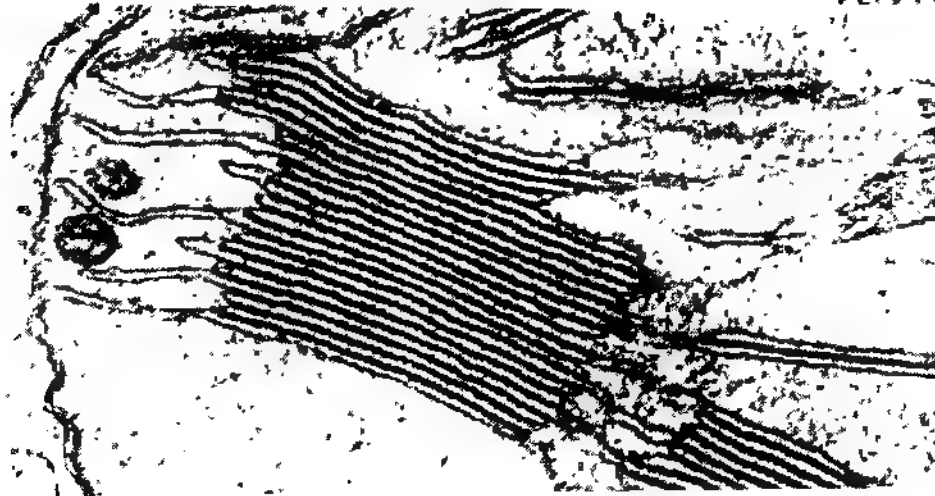
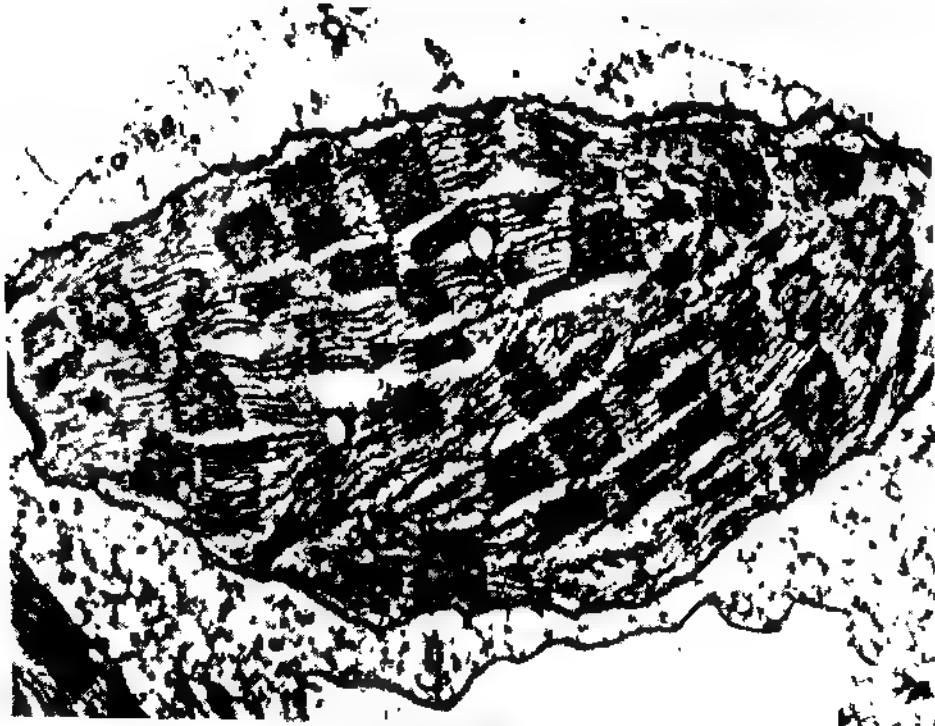
وبصفة عامة يتحلى كل نوع من الخلايا بخصائص تركيبية محددة تميزه عما سواه،  
ويلزم للدارس الإلمام بالتركيب لدقيق لمختلف أنواع الخلايا حتى يتسنى له فحص تركيب  
الخلوى للعبء تحت الدراسة ، كما تشهد بالمجهر الإلكتروني .

تمثل الأشكال ( ٢٤-١١ ) و ( ٢٥-١١ ) و ( ٢٦-١١ ) و ( ٢٧ ١١ ) أجزاء نباتية  
مختلفة ، كما تظهر عند فحصها بالمجهر الإلكتروني .



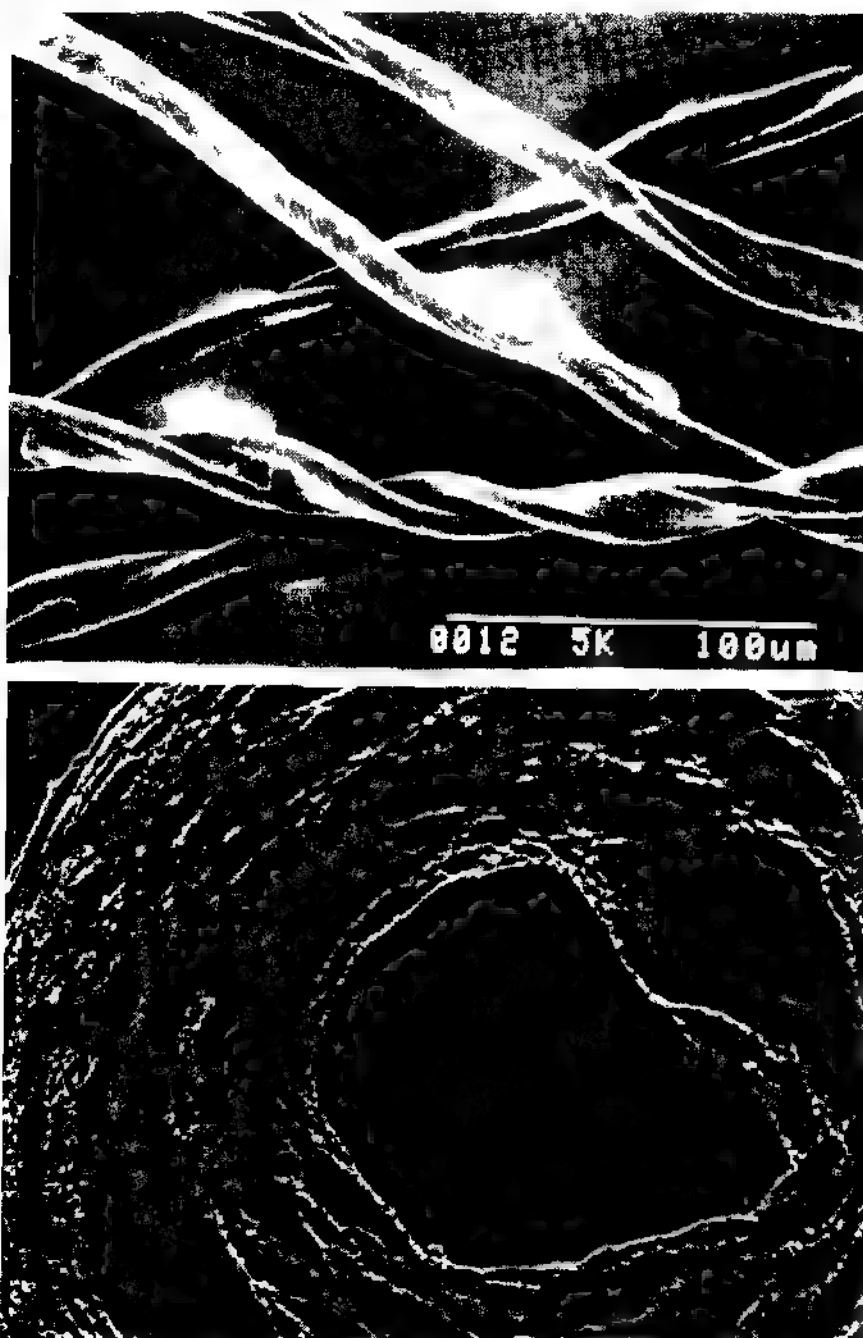


شكل (١١-٢٤) : تفاصيل تركيب خلية من قطاع عرضي في قمة الجذر كما تبدو بالمجهر  
 الإلكتروني المتخلل حيث: (n) النواة - (er) الشبكة الاندوبلازمية -  
 (m) الميتوكوندريا - (ga) جسم جولجي - (a) بلاستيدة - (nd) ثقب  
 في غشاء النواة (X 6000) .

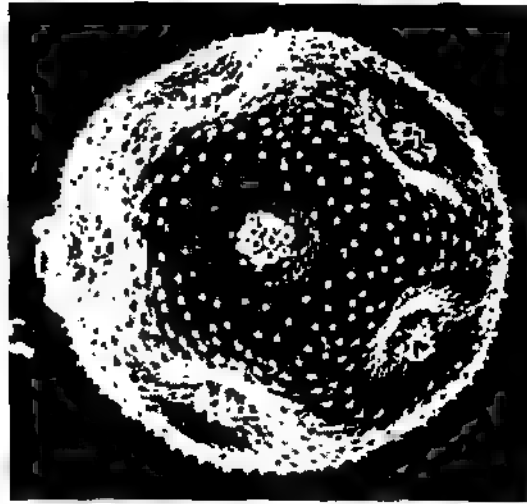
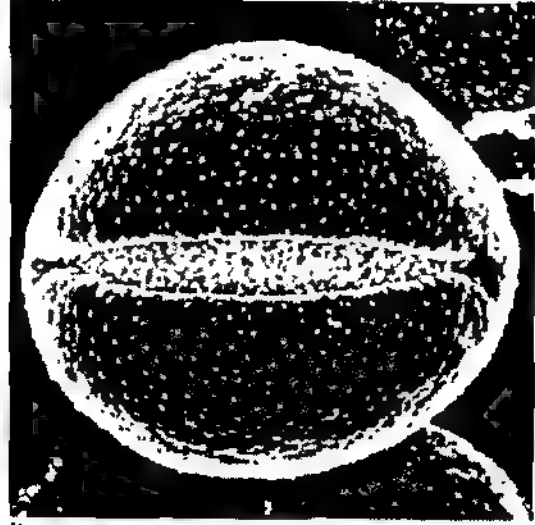
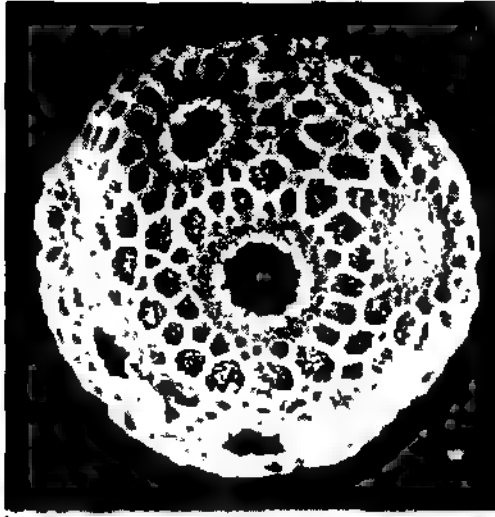


شكل (١١-٢٥) : تفاصيل تركيب لبلاستيدة اخضراء ، كما تظهر عند لفحص بالمجهر الإلكتروني المتخلل

إلى أعلى بلاستيدة كمة تحاط بغشاء مزدوج يغلف Stroma تحتوي  
 على Grana تتصل ببعضها بواسطة أغشية رقيقة (X 30 000)  
 - إلى أسفل جزء مكبر من البلاستيدة يوضح أغشية Thylakoids  
 مرتبة على هيئة أسطوانة قصيرة Granum وهذه تتصل بغيرها بالأغشية  
 الرقيقة - لاحظ القنطرة الربنية كأجسام مستديرة كثيفة (X 88000) .



- شكل (١١-٢٦) . تفاصيل تركيب شعرة افص ، كما تظهر عند المحصر بالمجهر الإلكتروني .
- إلى أعلى : منظر عام بالمجهر الإلكتروني المساح (X 500) .
- إلى أسفل : قطاع عرضي بالمجهر الإلكتروني المتخلل (X 3740) .



شكل (١١-٢٧) : تفاصيل تركيب جدار حبوب اللقاح لإظهار بعض أشكال زركشة الجدار، كما تبدو عند الفحص بالمجهر الإلكتروني المساح.  
(بولد وآخرون. Bold et al. ١٩٨٧)

(A) *Opuntia lindheimeri* (X 1600)

(B) *Cometes surattensis* (X 2100)

(C) *Pelucha trifida* (X 2000)

(D) *Cerastium alpinum* (X 1000)

### رابعاً : أنواع المجهر الحديثة

تطلق كلمة مجهر على أنواع عديدة من المحاهر دون عدسات زجاجية ، خلاف المجهر الإلكتروني، المتحلل والمجهر الإلكتروني المساح والمجهرات ، وهي تستخدم لتحقيق أغراض محددة ، تصم هذه الأنواع ما يلي .

Thermal emission microscope

Field ion microscope

Mirror electron microscope

Scanning acoustic microscope

Scanning laser acoustic microscope

X ray microscope

Scanning tunnelling microscope



المراجع





## المراجع

### أولاً: المراجع العربية

- محاضرات مقرر ميكروتنكث نباتي ( دراسات علي )  
عبد المجيد زاهر - قاسم فؤاد السحر - محمد عبد العزيز نصار  
قسم النبات الزراعي - كلية الزراعة - جامعة القاهرة .  
مقدمة علم الحياة العملي ( الجزء الأول )  
تبيه عبد الرحمن باعشن و أحمد جمال الغزاوي (١٩٨٥)  
كلية العلوم جامعة الملك عبد العزيز - جدة .

### ثانياً: المراجع الاجنبية

- Barnett, H.L. and B.B. Hunter (1987).  
Illustrated Genera of Imperfect Fungi (4th. Edit.)  
Mcmillan Publishing Co., Inc., N.Y. 225 pp.
- Bold, H.C.; C.J. Alexopoulos and T. Delevoryas (1987).  
Morphology of Plants and Fungi (5th. Edit.)  
Harber & Row Publishers. 912 pp.
- Gilman J.C. (1957).  
A Manual of Soil Fungi (2nd. Edit.)  
Iowa State University Press. 450 pp.
- Hanausek, T.F. (1907).  
The Microscopy of Technical Products.  
John Wiley & Sons. London. 471 pp.
- Hanlin, R.T. (1990).  
Illustrated Genera of Ascomycetes.  
American Phytopathological Society. 218 pp.

- Jackson, G. (1926).  
Crystal Violet and Erythrosin in Plant Anatomy.  
Stain Tech., 1 : 33-34.
- Richards, O.W. (1959).  
The Effective Use and Proper Care of the Microtome.  
American Optical Co. Buffalo, U.S.A. 92 pp.
- Radford, A.E.; W.C. Dickison; J.E. Massey and C.R. Bell (1974).  
Vascular Plant Systematics.  
Harber & Row Publishers, 891 pp.
- Sass, J.E. (1961).  
Botanical Microtechnique (3rd. Edit. Reprinted)  
Iowa State University Press, Ames. 228 pp.
- Sorvall, I. (1965).  
Thin Sectioning and Associated Technics for Electron  
Microscopy (2nd. Edit.)  
Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Connecticut, U.S.A. 113 pp.
- Stace, C.A. (1984).  
Plant Taxonomy and Biosystematics.  
Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, 279 pp.
- Willey, R.L. (1971).  
Microtechniques.  
A Laboratory Guide.  
Mcmillan Publishing Co., Inc., N.Y. 99 pp.
- Wiese, M.V. (1977).  
Compendium of Wheat Diseases.  
American Phytopathological Society. 106 pp.

Ames Lab-Tek (1965).

Operating Manual, Tissue-Tek

Microtome – Cryostat.

Ames Company, Inc. Westmont, Ill. 34 pp.

Carolina Catalog 64 (1994).

Biology / Science Materials.

Carolina Biological Supply Company

2700 York Road, Burlington, N (27215 – 3398).

P.O.Box 187, Gladstone, OR 97027-0187, U.S.A.

Carl Zeiss, Germany

Geschäftsbereich Mikroskopie Marketing Service

Postfach 1369/1380

D. 7082 Oberkochen

Ernst Leitz GMBH,

D-6330 Wetzlar, Germany

Nikon, Japan.

Nippon Kogaku K.K.

Fuji Bldg. 2-3, Marunouchi 3-chome, Chiyoda Ku.

Tokyo 100.

Philips, Eindhoven – The Netherlands

Schotanus, B.: Electron Microscopy, What is it ?

رقم الإيداع : ١٣١٣٣ / ٩٦

**عربية للطباعة والنشر**

٦٠٠٧ شارع السلام - أرض اللواء المنعمين

الهاتف: ٣٠٣٦٠٩٨٠٣٠٣١٠